

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Abteilung für angewandte und klinische Pharmakologie
Leiter: Professor Dr. med. M. Siess

Die Beteiligung des Glykogens am Energieumsatz isolierter, spontanschlagender Herzvorhöfe in Abhängigkeit von exogenen Substraten und nach Einwirkung von Adrenalin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Werner Itzel
aus Sofia/Bulgarien

Marburg 1969

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Abteilung für angewandte und klinische Pharmakologie
Leiter: Professor Dr. med. M. Siess

Die Beteiligung des Glykogens
am Energieumsatz isolierter,
spontanschlagender Herzvorhöfe
in Abhängigkeit von exogenen Substraten
und nach Einwirkung von Adrenalin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Werner Itzel

aus Sofia/Bulgarien

Marburg 1969

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am : 17. 2. 1969

Gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan :	Prof. Dr. med. W. Straub
Referent :	Prof. Dr. med. M. Siess
Correferent :	Prof. Dr. med. W. Schmid

<u>Inhaltsverzeichnis :</u>	<u>Seite</u>
I.) Einleitung	1
II.) Methodik	2
A) Versuchsmaterial	2
1.) Tiermaterial - Tierpräparation	2
2.) Nährlösungen	3
3.) Verwendete Substanzen	4
B) Versuchsanordnung	5
C) Bestimmung des Glykogens	5
1.) Prinzip der Methode	5
2.) Trennung und Hydrolyse des Glykogens	5
3.) Herstellung einer Eichkurve	8
4.) Berechnung	8
D) Histologische Darstellung des Glykogens	9
E) Bestimmung der Einbauraten aus ^{14}C -markierten Substraten in die Glykogenfraktion des Herzvorhofes	
III.) Versuchsergebnisse	12
A) Glykogengehalt der Herzvorhöfe sofort nach der Präparation und nach halbstündiger Vorbehandlung in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM Glucose	12
B) Inkubation von Vorhöfen in substratfreier Tyrode - lösung und in Tyrode mit exogenen Substraten	18
1.) Inkubation in substratfreier Tyrodelösung	18
2.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM Glucose	19
3.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 2 mM Hexanoat	20
4.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 10 mM Pyruvat	21
5.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von ^{14}C -Lactat	23
C) Einfluß von Adrenalin auf den Glykogengehalt isolierter Herzvorhöfe bei Inkubation mit verschiedenen Substraten	24
1.) Inkubation in substratfreier Tyrodelösung unter Zugabe von Adrenalin	24
2.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von Glucose, 25 Pyruvat oder Hexanoat unter gleichzeitiger Adrenalinzugabe	25

3.) Die Glykogenverarmung isolierter Herzvorhöfe unter gleichzeitiger Erhaltung der Funktion nach Inkubation in Tyrode mit 3 mM Glucose unter Adrenalineinwirkung	26
4.) Inkubation in substratfreier Tyrodelösung unter Zusatz von Adrenalin nach vorheriger Gabe von Propanolol	27
IV.) Diskussion	28
1.) Die Fütterungsabhängigkeit des Glykogengehaltes in Herzvorhöfen von Meerschweinchen	28
2.) Glykogengehalt von Herzvorhöfen in Tyrodelösung mit und ohne exogene Substrate	29
3.) Glykogengehalt bei Adrenalinzusatz	32
V.) Zusammenfassung	35
VI.) Literaturverzeichnis	37
VII.) Tabellenanhang	41

I.) Einleitung:

Am hiesigen Institut wurde in den letzten Jahren eine Methode entwickelt, die es erlaubt, an isolierten Herzvorhöfen von Meer - schweinchen den Substratumsatz bei Ruhe und Arbeit, gemessen an der $^{14}\text{CO}_2$ - Decarboxylierungsrate, gleichzeitig und fortlaufend mit der Herzleistung unter definierten Bedingungen zu beobachten (SIESS 1966, 1967; SIESS, MÜLLER, PETER 1967; GLOMME 1968). Im Hinblick auf diese Untersuchungen mit einigen für den Stoff - wechsel der Herzmuskelzelle wichtigen Metaboliten wie Glucose, Pyruvat, Lactat und Fettsäuren schien es wichtig, auch das Ver - halten der Glykogenreserven unter verschiedenen Versuchsbedingun - gen zu studieren. Beeinflußt doch der Glykogengehalt des Herzens einmal als variable Quelle endogener Kohlenhydrate auch die Auf - nahme und den Stoffwechsel exogener Substrate und hält zum an - deren bei Inkubation in substratfreier Nährlösung als alleinige endogene Energiequelle den Herzvorhof über Stunden funktionsfähig (SCHMID und SIESS 1956).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zunächst, den norma - len Glykogengehalt isolierter Meerschweinchenherzvorhöfe zu be - stimmen. Bei Durchsicht der umfangreichen Literatur zeigte sich, wie groß - unabhängig von Speziesunterschieden - die Schwankungen im Glykogengehalt von Warmblütlerherzen immer wieder beschrieben werden. ISSELHARD (1960) gelang es selbst unter strenger Stan - dardisierung der Methodik mit sofortigem Einfrieren von Meer - schweinchenherzen in flüssigem Sauerstoff sofort nach Tötung der Tiere nicht, eine wesentliche Verminderung der Streuungen zu er - zielen. Es liegen aber auch Arbeiten vor (LIEBIG 1940; KAULLIA und BOMSKOV 1942), bei denen durch Standardisierung der Tierhaltung, besonders der Fütterung, die Streuungen recht niedrig gehalten werden konnten. Daß der Stoffwechsel der Herzvorhöfe von Meer - schweinchen vom Futter abhängig ist, wurde bereits in früheren Arbeiten aus dem Institut (SIESS und GLOMME 1968; GLOMME 1968) festgestellt. Es war in diesem Zusammenhang somit wichtig, den Einfluß der Fütterung auf die Glykogenwerte zu überprüfen.

Nach Feststellung der Normalwerte und ihrer Schwankungen sollten in funktionellen Versuchen in vitro deren Veränderungen unter verschiedenen Einflüssen untersucht werden. Zunächst sollte

gezeigt werden, ob die Vorhöfe bei ausreichendem Angebot von Glucose imstande sind, ihre Glykogenreserven in vitro über Stunden beizubehalten. Weiter war zu untersuchen, wie schnell die Vorhöfe ihr Glykogen verlieren, wenn sie zur Energiegewinnung ganz auf ihre endogenen Nährstoffe angewiesen sind und in welchem Maße die Glykogenolyse durch die energetische Verwertung exogener Substrate eingeschränkt wird. Anschließend sollte gezeigt werden, wie stark Adrenalin den Abbau von Glykogen zu beschleunigen vermag, und ob exogene Substrate imstande sind, die unter Adrenalin verstärkte Glykogenolyse zurückzudrängen.

In diesem Zusammenhang war es wichtig zu wissen, ob und in welchem Maße die verwendeten Substrate außer der bloßen energetischen Verwertung auch zur Glykogensynthese herangezogen werden können. Dies wurde nach Messung von Leistung und Decarboxylierungsgeschwindigkeit im geschlossenen, rezirkulierenden System und anschließender Aufarbeitung des Herzvorhofs mit Glykogenbestimmung und Messung der Einbauraten markierter Substanzen in die Glykogenfraktion mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers untersucht.

II.) Methodik :

A) Versuchsmaterial :

1.) Tiermaterial - Tierpräparation :

Für die Versuche wurden 400 junge, männliche Meerschweinchen eines uneinheitlichen Stammes mit einem Gewicht von 250 bis 400 g verwendet. Sie erhielten neben Trockenfutter der Firma ALTROMIN (Lage/Lippe) Grünfutter und Karotten. In den Fütterungsversuchen wurden 30 Meerschweinchen des Reinzuchtstammes "Pirbright white" (Firma WAUSCHKUHN, Hann. Münden) verwandt. Davon wurde die Hälfte ausschließlich mit HEMO - Trockenfutter (Firma HEMO MOHR KG., Hann. Münden) ernährt, die andere Hälfte erhielt zusätzlich reichlich Grünfutter (Salat, Kohl, Karotten). Das Gewicht der Tiere war bei der Tötung 280 bis 320 g. Trinkwasser wurde in Saugflaschen angeboten. Die Herzvorhöfe hatten ein Feuchtgewicht von 70 bis 150 mg. Zunächst wurden die Tiere gewogen, dann durch

Nackenschlag getötet und auf ein Präparierbrett gespannt. Nach einem Medianschnitt vom Hals bis zur Symphyse wurde das Fell seitlich abgetrennt, die Bauchdecke bis zur Symphyse eröffnet und die Muskulatur seitlich am Thorax beiderseits bis zum Rücken abgeschnitten. Von unten her wurde der Thorax an den Rippenbögen weit seitlich durchtrennt, das Zwerchfell am Rippenbogen abgeschnitten, und die aufgeklappte Thoraxvorderwand an der Clavicula aufgetrennt. Beide Lungenflügel wurden am Hilus abgeschnitten. Der Herzbeutel wurde leicht gespannt, aufgeschnitten und nach hinten gestreift, bis die Herzohren freilagen. Nun wurde die Herzspitze gefaßt und die Kammermuskulatur nahe der Vorhofkammergrenze abgeschnitten. Die Herzvorhöfe wurden dann von den beiden V. cavae und vom Mediastinum abgetrennt und in Petrischalen mit Tyrode blutleer gespült. Die Reste der Ventrikelmuskulatur mit Aorta und A. pulmonalis wurden am Anulus fibrosus sauber entfernt. Evtl. Thromben wurden vorsichtig aus den Herzohren gelöst. Dann wurde das Präparat mit kleinen Serfinen aus einer Platin-Silber-Legierung an den Herzohren gefaßt und in der Fritte befestigt. Vom Zeitpunkt der Tötung der Tiere bis zum Einbringen in die Fritte vergingen etwa 5 Minuten.

2.) Nährlösungen :

a) Tyrodelösung :

Die Nährlösung wurde nach Tyrode in folgender Zusammensetzung verwendet (alle Substanzen "MERCK" p. a.) :

NaCl	0,8	%
KCl	0,02	%
CaCl ₂	0,02	%
MgCl ₂	0,01	%
NaHCO ₃	0,1	%
NaH ₂ PO ₄	0,005	%

b) Glucose - Tyrodelösung :

Zu 1000 ml der oben angegebenen Tyrode wurden 2,9727 g D(+)-Glucose zugegeben (15 mMol). Die 3 mM Glucose enthaltende Tyrodelösung wurde durch entsprechende Verdünnung hergestellt. Der pH-Wert bei Durchperlung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ betrug 7.1 - 7.2. Die Temperatur der Lösungen

war in allen Versuchen auf 30° C eingestellt.

3.) Verwendete Substanzen :

a) D(+)-Glucose	Merck
b) Na-Pyruvat	Merck
c) Na-Hexanoat (Na-Capronat)	Riedel-de Haen
d) Adrenalin(Suprarenin ^R)	Hoechst
e) D(+)-Glucose ¹⁴ C (U) CFB 2	Radiochemical Centre
f) Na-Pyruvat ¹⁴ C (U) CFA 230	Amersham (England)
g) Na-L-Lactat ¹⁴ C (U) CFB 97	" "
h) Na-n-Hexanoat ¹⁴ C (1) CFA 118	" "

Die in eingeschmolzenen Ampullen befindlichen ¹⁴C-mar -
kierten Substanzen von 50 bzw. 100 µC wurden jeweils in 50 ml
frisch bereiteter Tyrodelösung gelöst, welcher vorher nicht -
markierte Trägersubstanz in Höhe der gewünschten spezifischen
Aktivität und Konzentration zugegeben worden war. Nach Pas -
sieren eines Bakterienfilters wurden je 7 ml in sterile Glas -
röhrchen mit Schliffstopfen abgefüllt und bei -20° C einge -
froren.

B) Versuchsanordnung :

Nach der Präparation wurden die Herzvorhöfe in eine Glas -
fritte mit 30 ml Nährlösung eingebracht, die mit 95 % O₂ und
5 % CO₂ durchperlt wurde. Die Fritte befand sich in einem
Wasserbad mit konstanter Temperatur von 30° C. Die Vorhöfe
waren an den Herzhörspitzen so befestigt, daß jeweils der
linke Vorhof am Boden der Fritte über eine kleine Klemme aus
Silberfederdraht (DEGUSSA, 900/000 - 0,1 mmØ) und einem Faden
mit einem Schwedenhebel in Verbindung stand (Übersetzung 1 : 15,
ca. 1 g Belastung). Mittels dieses Hebels wurden die isoto -
nischen Vorhofkontraktionen unter automatischer Zeitschrei -
bung auf die berußte Trommel eines Kymographen aufgezeichnet.
Die Funktionskurven wurden nach Beendigung des Versuchs mit
Zapon-Lack fixiert. Die Herzfrequenz wurde mit einer Stopp -
uhr gemessen. Beim Spülen wurde mit einem Saugröhrchen, das
über einen Schlauch mit der Wasserstrahlpumpe verbunden war,
abgesaugt.

Die Versuche mit radioaktiven Substraten wurden in einem geschlossenen System aus Muskelkammer und Oxygenatorkammer durchgeführt, das zur Messung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit markierter Substrate unter gleichzeitiger Registrierung der Herzleistung am hiesigen Institut in den letzten Jahren entwickelt wurde. Eine ausführliche Beschreibung der Versuchsanordnung findet sich in den Arbeiten von SIESS (1966, 1967); MÜLLER (1967); PETER (1967); GLOMME (1968).

C) Bestimmung des Glykogens :

1.) Prinzip der Methode :

Die Bestimmung des Glykogens erfolgte nach der von BALZER, HOLTZ und PALM (1962) angegebenen Methode ohne Trennung in "freies" und "gebundenes" Glykogen durch Trichloressigsäure - Extraktion. Zunächst wurde der Vorhof in Kalilauge bis zur völligen Auflösung gekocht, dann das so extrahierte Glykogen mit Äthanol gefällt, und anschließend durch Zentrifugieren in Interstitium und Cytoplasma mit dem Überstand dekantiert. Durch Waschen des Rückstandes in Methanol - Chloroform und nachfolgender Zentrifugation wurden die Lipide abgetrennt. Der Rückstand wurde in HCl gelöst und durch einstündiges Kochen das Glykogen zu Glucose hydrolysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Glucose im Überstand mit dem Blutzucker - Farbstest (Firma BÖHRINGER) bestimmt.

2.) Trennung und Hydrolyse des Glykogens :

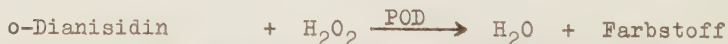
a) Nach Beendigung des Versuchs wurde der Vorhof aus der Fritte genommen, die anhaftende Flüssigkeit vorsichtig ohne Quetschen abgetupft und auf einer Torsionswaage (Nr. 4136, Vereinigte Draadfabrieken, Nijmegen) schnell das Feuchtgewicht auf 1 mg Genauigkeit bestimmt. Dann wurde der Vorhof sofort in ein Glasröhrchen mit eingeschliffenem Glasstopfen gebracht, in das vorher 1 ml 30 %ige KOH pipettiert worden war und 20 Minuten im siedenden Wasserbad aufgekocht. Das Intervall zwischen Abnahme und Einbringen in KOH lag zwischen 20 - 30 Sekunden. Nach dem Erkalten wurde 6 ml 100 %iges reines Äthanol zugegeben (DAB VI, Merck Nr. 970), das Röhrchen im Kühlschrank

(18 Stunden - 2 Tage) stehen lassen und der Ausfall des Gly - kogens abgewartet.

b) In einem Arbeitsgang wurden nun jeweils 6 Vorhöfe bis zur Extinktionsbestimmung weiterverarbeitet. Zunächst wurde in einer Zentrifuge (Fa. CHRIST, Typ UJ 2) bei 3000 U zentri - fugiert und der Überstand (I) dekantiert. Der Rückstand wurde mit 5 ml eines heißen Methanol-Chloroform - Gemisches (4 : 1) nach KERR zur Entfernung der Lipide 30 Minuten im Wasserbad von 50° C mit einem Magnetrührer gewaschen. Dann wurde wie - derum bei 3000 U zentrifugiert und der Überstand (II) dekan - tiert (Lipide). Der Rückstand wurde in 1 ml 1 n HCl gelöst und im siedenden Wasserbad 1 Stunde hydrolysiert. Auch zwei - stündiges Hydrolysieren veränderte die Ergebnisse nicht. Nach Abkühlen wurde 20 Minuten bei 3000 U zentrifugiert und der Überstand dekantiert (Glucose). Vom Überstand wurden anschlies - send 0,5 ml abpipettiert und mit 0,5 ml 1 n NaOH neutralisiert (III). Ein Zusatz von Methylorange als Indikator, der bei der Extinktionsbestimmung stört, erübrigte sich, da wir mit einer Mikroelektrode feststellten, daß der Phosphatpuffer beim En - zymansatz die Proben exakt auf pH 7.0 abpuffert.

3.) Bestimmung des hydrolysierten Glykogens als Glucose :

Zur Glucose - Bestimmung wurde der Blutzucker - Farbtest der Firma Böhrringer nach der Methode von HUGGET-NIXON (1956) verwendet. Dabei werden die Enzyme Glucoseoxydase (GOD) und Peroxydase (POD) sowie o-Dianisidin benutzt, das in folgender Reaktion zu einem rotbraunen Farbstoff oxydiert wird :



Die Extinktion des Farbstoffs soll bei der Wellenlänge von 430 - 480 nm gemessen werden. Als Extinktionsmaximum ermittelt - ten wir 460 nm.

Benutzt wurde T-C-M III für 500 Bestim ungen. Dazu wurde zunächst der Inhalt der Flasche 1 (0,10 M Phosphatpuffer, 40 g POD/ml, 250 g GOD) in 1000 ml Aqua bidest gelöst, die

Lösung mit der Wasserstrahlpumpe durch ein Bakterienfilter gesaugt und in 100 ml - Portionen aufgeteilt. In gleicher Weise wurde der Inhalt der Flasche 2 (6,6 µg o-Dianisidin - hydrochlorid) in 40 ml Aqua dest. gelöst, durch ein Bakterien - filter gefiltert und in kleine Portionen aufgeteilt. Die Lö - sung 3 (91 µg Glucose/ml) wurde unverdünnt verwendet. Wir fanden, daß sich bei Einfrieren des Dianisidins ein Nieder - schlag bildete, der sich bei Erwärmen nicht wieder auflöste und die Lösung unbrauchbar wurde. So wurden sämtliche Lösungen in vorher sterilisierten Gläschen im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt. Vor Beginn des Testansatzes wurde für eine Be - stimmungsserie das benötigte Glucose-Reagenz (Lösung 4) her - gestellt. Für die sechs Proben wurden 0,5 ml der Lösung 2 mit 50 ml der Lösung 1 unter kräftigem Schütteln gemischt und die Lösung anschließend auf Zimmertemperatur gebracht.

Für den Testansatz wurden Enzympipetten mit langausge - zogener Spitze verwendet. Es wurden in folgender Reihenfolge in Reagenzgläser pipettiert :

	<u>Leerwert</u>	<u>Standard 1 + 2</u>	<u>Probe I - VI</u>
Aqua dest.	0,10 ml	-----	-----
Lösung 3	-----	0,10 ml	-----
Überstand	-----	-----	0,10 ml
Lösung 4	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml

Durch mehrmaliges Messen mit einer Mikroelektrode in einem pH-Meter der Firma KNICK wurde sichergestellt, daß der in Lösung 4 enthaltene Phosphatpuffer die Proben exakt auf einen pH von 7.0 abpufferte.

Die Testansätze wurden gut gemischt und 35 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend wurde in einem ZEISS Spektrophotometer PM Q II mit 1 cm Glasküvetten bei 460 nm die Extinktion der Proben (Ext_{Probe}) und der Stan - dards ($Ext_{Standard}$) gegen den Leerwert gemessen.

3.) Herstellung einer Eichkurve :

In einer Kontrollserie wurde ermittelt, ob der Linearitätsbereich nicht verlassen wurde. Dazu wurde mit selbst eingewogener Glucose eine 2 molare Lösung als Standard angesetzt und in aufsteigender Konzentration von 0,025 - 0,200 ml in Reagenzgläser pipettiert. Anschließend wurden 5 ml der Lösung 5 zugegeben und nach 35 Minuten die Extinktionswerte bestimmt (Tab. I, Abb. 1) :

Tabelle I : Extinktionswerte zur Eichkurve in Abbildung 1

Reagenzglas	Glucose-lösung	Glucose nanoMol	Lösung 4	Extinktion bei 460 nm
I	0,025 ml	50	5 ml	0,078
II	0,050 ml	100	5 ml	0,167
III	0,075 ml	150	5 ml	0,249
IV	0,100 ml	200	5 ml	0,334
V	0,125 ml	250	5 ml	0,411
VI	0,150 ml	300	5 ml	0,469
VII	0,175 ml	350	5 ml	0,563
VIII	0,200 ml	400	5 ml	0,652

Die Eichkurve stimmte mit dem zum Blutzucker-Farbttest (Böhlinger) gelieferten Standard genau überein.

4.) Berechnung :

Es wurden 0,2 ml Probe aus 2,0 ml Extrakt pipettiert. In 0,1 ml des Standards (91 µg/ml) sind 9,1 µg. Dann sind in 2 ml 182 µg Glucose. Daher gilt :

$$\frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}}}{\text{Extinktion}_{\text{Standard}}} = \frac{x}{182} = \mu\text{g Glucose in 2 ml}$$

Eichkurve der Glucose-Bestimmung.

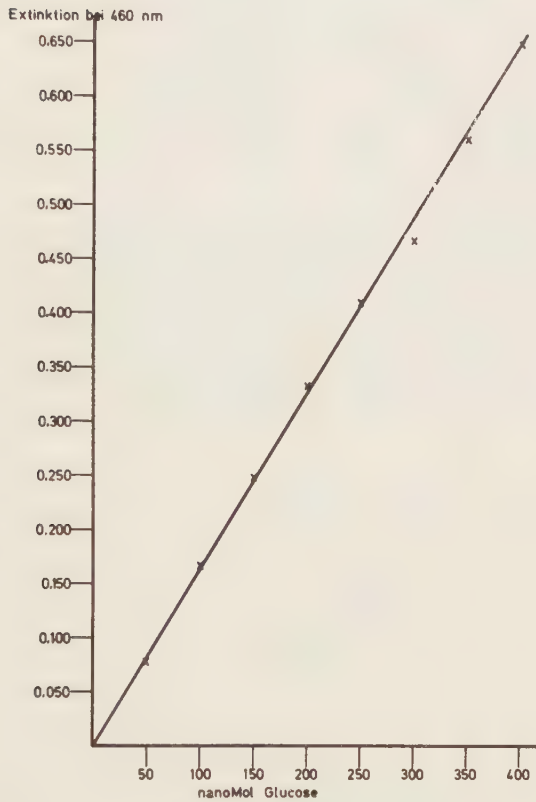


Abb. 1

$$X = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} \times 182}{\text{Extinktion}_{\text{Standard}}} = \mu\text{g Glucose im Vorhof}$$

Umrechnung auf Mol :

$$180,16 \mu\text{g} = 1 \mu\text{Mol}$$

$$1 \mu\text{g} = \frac{1 \times 182}{180,16} \mu\text{Mol} = 1,010 \mu\text{Mol}$$

$$X = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} \times 1,010}{\text{Extinktion}_{\text{Standard}}} = \mu\text{Mol Glucose}$$

Die Glykogenwerte wurden generell in $\mu\text{Mol Glucose}/100 \text{ mg}$ Feuchtgewicht (F.G.) angegeben. Von jeder Versuchsreihe wurden die Mittelwerte ($\bar{X}$) und die mittlere Streuung des Mittelwertes (σ_m) berechnet. Die Signifikanzberechnung erfolgte entsprechend der Formel für S_D bei kleinen Stichproben und die Beurteilung nach dem t-Test nach STUDENT (GEIGY-Tabellen).

D) Histologische Darstellung des Glykogens :

Die Herzvorhöfe wurden sofort nach Versuchsende in 100 pro - zentigem Alkohol von 0°C fixiert, und nach Einbettung über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin $7,5 \mu$ - Schnitte ange - fertigt. An diesen wurde nach Mc MANUS die PAS - Reaktion durchgeführt (SIESS und PETTE 1960).

E) Bestimmung der Einbauraten aus ^{14}C -markierten Substraten in die Glykogenfraktion des Herzvorhofes :

Die Einbauraten der radioaktiv markierten Substanzen wurden mit Hilfe eines Liquid Scintillation Counter (Mark I, Firma NUCLEAR, Chicago) bestimmt. Als Flüssigkeitsszintilla - tor diente eine Lösung von 100 g PPO (2,5-diphenyloxazol) und 1,25 g POPOP (2-p-phenylen-bis-(5-phenyloxazol)) in 1000 ml Toluol (Miquifluor*, Firma NUCLEAR, Chicago). 40 ml dieses Konzentrates wurden in 1000 ml Toluol gelöst und davon je - weils 15 ml in Spezialzählgläschen einpipettiert. Zur Messung der Zählraten der Proben wurden jeweils 0,05 ml der Überstände I - III auf kreisrunde Filterpapierblättchen (Firma SCHLEICHER und SCHÜLL, Einbeck, Nr. 595) mit einem Durchmesser von 2,7 cm

aufgetragen. Nach Trocknung in einem Kaltluftstrom wurden die Blättchen mit einer Pinzette in die Meßfläschchen mit dem Flüssigkeitsszintillator eingebracht. Alle Meßfläschchen wurden vor Gebrauch zuerst mit Detergentien, dann mit Alkohol und zuletzt mit Aqua bidest. gereinigt und in Heißluft getrocknet. Anschließend wurde 15 ml Szintillationsflüssigkeit eingegeben und in einem Leerversuch alle Fläschchen auf Kontamination geprüft.

Jede Probe wurde vom Szintillationszähler 10 Minuten gezählt und auf Zerfälle pro Minute (cpm) umgerechnet. Anschließend wurde jedesmal durch Zählung von Barium¹³¹ als externen Standard ein Quenchwert ausgedruckt, mit dem auf einer Quenchkurve die Ausbeute kontrolliert werden konnte. Mit 82 - 85 % war sie fast optimal und ihre Streuung lag innerhalb der Fehlerbreite, sodaß sich eine Korrektur der Zählwerte erübrigte.

Durch Umrechnung wurde die Gesamtaktivität der Proben ermittelt :

1.) Überstand I :

$$6,00 \text{ ml Äthanol} + 1,00 \text{ ml KOH} = 7,00 \text{ ml}$$

$$0,05 \text{ ml} \times 140 = 7,00 \text{ ml}$$

$$\text{cpm}_I \times 140 = \text{cpm}_{\text{Gesamt}}$$

(Extrazellulärraum und nichtglykogenhaltige Bestandteile der Herzmuskelzellen).

2.) 5,00 ml Methanol-Chloroform - Gemisch

$$0,05 \text{ ml} \times 100 = 5,00 \text{ ml}$$

$$\text{cpm}_{II} \times 100 = \text{cpm}_{\text{Gesamt}}$$

(Vom Glykogen abwaschbare Lipide).

3.) Überstand III :

$$1,00 \text{ ml HCl} + 1,00 \text{ ml NaOH} = 2,00 \text{ ml}$$

$$0,05 \text{ ml} \times 40 = 2,00 \text{ ml}$$

$$\text{cpm}_{III} \times 40 = \text{cpm}_{\text{Gesamt}}$$

(GLYKOGEN).

Zur Umrechnung der cpm in μMol eingebaute Substanz mußte in einer Eichkurve ermittelt werden, wieviel nanoCurie den gezählten cpm entsprachen. Als Standard diente eine 30 mM Glucose -

Lösung mit der spezifischen Aktivität $1 \mu\text{C}/15 \mu\text{Mol}$. Durch Verdünnung $1 : 100$ wurde daraus der endgültige Standard hergestellt, der in $0,1 \text{ ml}$ 2 nanoCurie enthielt. Davon wurden jeweils $10 \times 0,0125; 0,025; 0,050; 0,075$ und $0,100 \text{ ml}$ auf Papierblättchen aufpipettiert und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Tabelle II zeigt die Werte, Abbildung 2 die Eichkurve.

Tabelle II : Eichwerte mit einer $1 : 100$ verdünnten 30 mM - Glucoselösung mit der spezifischen Aktivität $1 \mu\text{C}/15 \mu\text{Mol}$.

$0,0125 \text{ ml}$ ($0,25 \text{ nC } ^{14}\text{C}$)	$0,025 \text{ ml}$ ($0,50 \text{ nC } ^{14}\text{C}$)	$0,050 \text{ ml}$ ($1,0 \text{ nC } ^{14}\text{C}$)	$0,075 \text{ ml}$ ($1,5 \text{ nC } ^{14}\text{C}$)	$0,10 \text{ ml}$ ($2,0 \text{ nC } ^{14}\text{C}$)
318	632	1178	1841	2403
298	634	1228	1823	2396
323	623	1214	1798	2431
344	651	1241	1815	2441
303	636	1229	1822	2527
308	603	1238	1835	2480
323	594	1246	1831	2403
314	645	1259	1809	2391
289	622	1229	1827	2439
343	618	1268	1811	2455
$\bar{x} = 316$	625	1233	1822	2436

Bei allen Messungen wurde dann jedesmal ein markierter Standard in verschiedenen Konzentrationen mitgezählt, um die Eichkurve zu kontrollieren. Es zeigten sich dabei keine wesentlichen Änderungen der Eichwerte :

1230 cpm entsprachen im Mittel 1 nanoCurie . Entsprechend der spezifischen Aktivität der jeweiligen Substrate ($1 \mu\text{C}/7,5 \mu\text{Mol}$, bzw. $1 \mu\text{C}/15 \mu\text{Mol}$) wurde dann auf μMol markierten exogenen Substrates umgerechnet. Bei ^{14}C -Glucose und ^{14}C -Hexanoat konnte direkt der prozentuale Anteil am Gesamtglykogen berechnet werden, bei ^{14}C -Lactat und ^{14}C -Pyruvat wurden die in nanoMol anfallenden Substratanteile im Glykogen durch zwei dividiert und dieser Wert als Glucoseäquivalent zum Gesamtglykogen in Beziehung

*Eichkurve der ^{14}C -Aktivität im Flüssigkeits-
Szintillationszähler.*

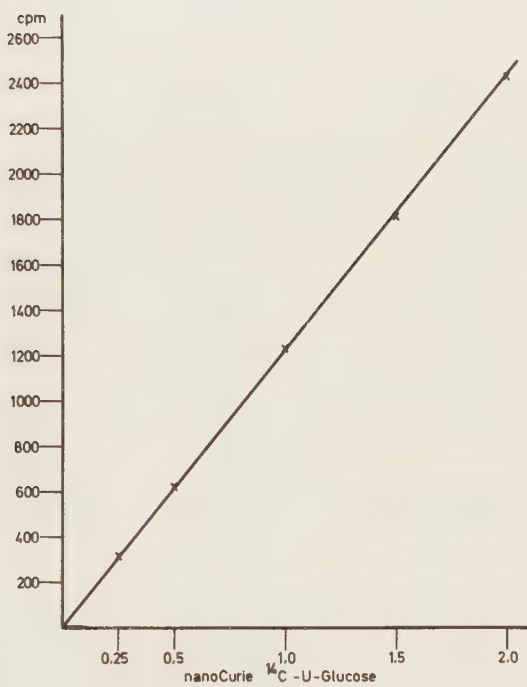


Abb. 2

gesetzt. Für die übrigen Fraktionen kann über Einbau bzw. Metabolisierung nichts ausgesagt werden. Es kann nur festgestellt werden, daß die Aktivität aus einem bestimmten Anteil (in μMol exogenen Substrates) herrühren muß.

III.) V Versuchsergebnisse:

A) Glykogengehalt der Herzvorhöfe sofort nach der Präparation und nach halbstündiger Vorbehandlung in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM Glucose:

Als Ausgangspunkt für die nachfolgenden funktionellen Versuche mußte zunächst der Glykogengehalt isolierter Herzvorhöfe sofort nach Tötung der Tiere ermittelt werden. Um einen Überblick über die Normalwerte und deren Streuung zu erhalten, bestimmten wir bei einer Serie von 12 Tieren das Glykogen unmittelbar nach der Präparation (Tab. III).

Tabelle III: Glykogengehalt sofort nach Präparation.
(Serie 1, April 1968)

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μMol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μMol Glucose
A 25	120	4,546	3,789
A 26	142	5,971	4,204
A 27	141	5,044	3,577
A 28	94	3,684	3,920
A 29	116	4,126	3,556
A 30	139	5,136	3,694
A 31	110	4,517	4,155
A 32	108	3,773	3,493
A 33	110	4,082	3,710
A 34	102	3,207	3,144
A 35	128	5,581	4,360
A 36	157	6,188	3,941

$N = 12$, $\bar{X} = 3,795 \mu\text{Mol Glucose} / 100 \text{ mg F.G.}$, $G_m = 0,115$

Diese Werte konnten wir fünf Monate später in einer zweiten Serie, die wir zur Kontrolle durchführten, bestätigen (Tab.IV).

Tabelle IV : Glykogengehalt sofort nach Präparation.
(Serie 2, September 1968)

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μ Mol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μ Mol Glucose
D 1	104	3,528	3,393
D 2	105	3,908	3,722
D 3	130	5,146	3,959
D 4	122	5,429	4,450
D 5	109	3,517	3,227
D 6	128	4,708	3,678
D 13	105	4,337	4,132
D 14	91	2,400	2,638
D 15	101	3,678	3,642
D 16	90	3,741	4,156
D 17	103	4,420	4,292
D 18	89	2,719	3,056

$$N = 12$$

$$\bar{X} = 3,695 \mu\text{Mol Glucose}/100 \text{ mg F.G.}$$

$$\sigma_m = 0,155$$

In der Vorstellung, daß bereits während der hypoxischen Bedingungen der Präparation ein Teil des Glykogens verloren geht, untersuchten wir nun in weiteren Serien, ob und in welchem Maße die Vorhöfe imstande sind, ihre verminderten Glykogenvorräte in funktionellen Versuchen in vitro wieder aufzufüllen. Dazu ließen wir sie 1/2 Stunde lang in einer 15 mM Glucose enthaltenden Tyrodelösung unter optimaler O_2 -Durchperlung (95 % O_2 , 5 % CO_2) schlagen und bestimmten anschließend den Glykogengehalt (Tab. V).

Tabelle V : Glykogengehalt nach halbstündiger Vorbehandlung
in Tyrode mit Zusatz von 15 mM Glucose.
(April 1968)

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μ Mol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μ Mol Glucose
A 41	105	5,407	5,150
A 42	130	5,860	4,507
A 43	146	5,169	3,540
A 44	98	4,810	4,908
A 45	118	5,223	4,426
A 46	97	4,161	4,289
A 51	103	4,638	4,503
A 52	131	4,761	3,634
A 53	111	4,805	4,329
A 54	108	3,906	3,617
A 55	104	4,394	4,225
A 56	90	3,684	4,093
A 59	123	5,849	4,736
A 60	116	5,086	4,384
A 61	141	6,048	4,314

N = 15

$\bar{X}$ = 4,310 μ Mol Glucose/100 mg F.G.

σ_m = 0,115

Tab. V:Tab. IV

p = <0,01

t = 2,710

Die Differenz ist signifikant und zeigt, daß eine Neusynthese von Glykogen stattfindet, wahrscheinlich soweit es vom Zeitpunkt der Tötung der Tiere bis zum Einbringen in die Fritte zu einem Verlust gekommen war.

Bei den folgenden funktionellen Versuchen behandelten wir jeden Vorhof 1/2 Stunde in Tyrode + 15 mM Glucose vor und gingen damit von einem mittleren Glykogengehalt von 4,3 μ Mol $\pm$ 0,115/100 mg F.G. als Kontrollwert aus. Dieser Kontrollwert wurde während der Funktionsversuche durch ein - geschobene Halbstunden-Versuche kontrolliert. In zwei solcher Kontrollserien fiel uns auf, daß der Glykogengehalt gegenüber

den sonstigen Werten nach halbstündiger Glucosevorbehandlung plötzlich stark und signifikant erniedrigt war (Tab. VI).

Tabelle VI : Glykogengehalt nach halbstündiger Vorbehandlung in Tyrode + 15 mM Glucose.
(August 1968)

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μ Mol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μ Mol Glucose
<u>Serie 1 :</u>			
B 83	142	5,600	3,943
B 84	145	5,600	3,826
B 85	136	3,580	2,622
B 86	162	4,337	2,677
B 87	144	4,842	3,363
B 88	127	3,109	2,448
N =	6	Tab. VI ₁ : Tab. V	
$\bar{X}$ =	3,152 μ Mol Glucose/100 mg F.G.	p =	<0,001
σ_m =	0,251	t =	-4,745

<u>Serie 2 :</u>			
C 73	87	2,482	3,853
C 74	86	2,304	2,680
C 75	90	2,043	2,270
C 76	107	3,017	2,820
C 77	105	3,136	2,986
C 78	101	3,148	3,133
N =	6	Tab. VI ₂ : Tab. V	
$\bar{X}$ =	2,957 μ Mol Glucose/100 mg F.G.	p =	<0,001
σ_m =	0,215	t =	-5,831

In dieser Zeit hatten die Tiere nur unregelmäßig Grünfutter erhalten und waren hauptsächlich von Trockenfutter ernährt worden. Da entsprechende Hinweise aus der Literatur vorlagen

(LIEBIG 1940; BOMSKOV und KAULLA 1942), versuchten wir, in einem Kontrollversuch nachzuweisen, ob die Fütterung für die plötzliche Schwankung unserer Ausgangswerte verantwortlich zu machen sei. Dazu verwandten wir junge Tiere des Reinzucht - stammes "Pirbright white" mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150 g. Eine Serie von 12 Tieren wurde ausschließlich mit Trockenfutter ernährt, während eine zweite Serie zusätzlich reichlich Karotten und Grünfutter (Salat und Grünkohl) erhielt. Nach 14 Tagen wurden die Tiere bei einem mittleren Gewicht von 300 g getötet und der Glykogengehalt der Vorhöfe sofort nach Präparation und nach Vorbehandlung in Tyrode + 15 mM Glucose bestimmt. Die Tabellen VII und VIII zeigen die erhaltenen Werte.

Tabelle VII : Glykogengehalt bei zusätzlicher Ernährung mit Frischfutter.
(November 1968)

Versuch	Vorhof-	Glykogen	Glykogen
Nr.	Feuchtgew.	pro Vorhof	pro 100 mg F.G.
	in mg	in μ Mol Glucose	in μ Mol Glucose
<u>Serie 1: Sofortfixation nach Präparation</u>			
F 7	142	5,322	3,755
F 8	122	4,368	3,580
F 9	134	4,415	3,294
F 10	142	4,538	3,196
F 11	133	5,208	3,916
F 12	120	4,311	3,593
N =	6		
$\bar{X}$ =	3,555 μ Mol Glucose/100 mg F.G.		
G_m =	0,110		
<u>Serie 2: 1/2 Stunde in Tyrode + 15 mM Glucose</u>			
F 1	139	5,781	4,159
F 2	144	5,722	3,974
F 3	110	4,446	4,041
F 4	132	5,363	4,062
F 5	126	4,805	3,813
F 6	135	5,606	4,152
N =	6		
$\bar{X}$ =	4,033 μ Mol Glucose/100 mg F.G.		
G_m =	0,058		
		<u>Serie 2 : Serie 1</u>	
		p =	< 0,001
		t =	+3,983

Tabelle VIII : Glykogengehalt bei ausschließlicher Ernährung
mit Trockenfutter.
(November 1968)

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in $\mu\text{Mol Glucose}$	Glykogen pro 100 mg F.G. in $\mu\text{Mol Glucose}$
<u>Serie 1</u> : Sofortfixation nach Präparation			
T 7	130	4,027	3,098
T 8	118	4,153	3,519
T 9	138	4,395	3,185
T 10	144	4,455	3,093
T 11	118	3,683	3,121
T 12	137	4,110	3,000
N = 6			Tab. VIII ₁ : Tab.VII ₁
$\bar{X}$ = 3,169 $\mu\text{Mol Glucose}/100 \text{ mg F.G.}$			p = <0,01
σ_m = 0,075			t = -2,838
<u>Serie 2</u> : 1/2 Stunde in Tyrode + 15 mM Glucose			
T 1	132	4,368	3,309
T 2	127	3,851	3,032
T 3	126	4,180	3,317
T 4	142	4,074	2,869
T 5	129	4,708	3,650
T 6	117	4,368	3,733
N = 6			Tab. VIII ₂ : Tab.VII ₂
$\bar{X}$ = 3,318 $\mu\text{Mol Glucose}/100 \text{ mg F.G.}$			p = <0,001
σ_m = 0,140			t = -4,766
			<u>Serie 2 : Serie 1</u>
			p = <0,40
			t = 0,955

Es konnte also bestätigt werden, daß der Glykogengehalt der Herzvorhöfe wesentlich von der Fütterung abhängig ist. Daraus ergibt sich die Forderung, die Tiere über längere Zeit mit

einem konstant zusammengesetzten Futter zu ernähren, wenn man bei funktionellen Versuchen von reproduzierbaren Glykogen - werten ausgehen will. Allerdings ist im Winter die Einstellung auf Sommerkost und die entsprechenden Werte nicht einfach, worauf schon KAULLA (1942) hinwies. Die mit Grünfutter erreichten Werte im Winter (November 1968) liegen mit $4,0 \mu\text{Mol}$ im unteren Streubereich der Sommerwerte.

B) Inkubation von Vorhöfen in substratfreier Tyrodelösung und in Tyrode mit exogenen Substraten :

1.) Inkubation in substratfreier Tyrodelösung : (Abb. 3 - 5 und Tabelle 1)

Entzieht man isolierten Herzvorhöfen jedes exogene Substrat, so sind sie zur Energiegewinnung ganz auf ihre endogenen Glykogen- und Lipidreserven angewiesen. In Funktionsversuchen sollte daher gezeigt werden, wie schnell das Glykogen abgebaut wird, wenn man die Vorhöfe längere Zeit in substratfreier Nährlösung schlagen läßt. Wir inkubierten Serien von je 6 Vorhöfen nach halbstündiger Vorbehandlung in 15 mM Glucose und dreimaligem Spülen mit Tyrode 2, 4 und 6 Stunden in einer n-Tyrodelösung (Abb. 3). Anschließend bestimmten wir den Glykogengehalt. Die Werte zeigen, daß sich das Glykogen mit der Schlagzeit der Vorhöfe vermindert und nach 6 Stunden nur noch etwa 30 % des Ausgangswertes beträgt (Abb. 4). Die stärkste Abnahme findet sich in den ersten beiden Stunden und entspricht einem Verbrauch von $0,72 \mu\text{Mol/h}$ und 100 mg F.G. Dieser Wert liegt in der oberen Streubreite der mit $^{14}\text{C-Glu}$ - cose bestimmten Decarboxylierungsgeschwindigkeit bei 15 mM Glucose als Substrat. Wahrscheinlich ist der etwas höhere Wert darauf zurückzuführen, daß bei der Messung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit nicht der Anteil von endogenem Substrat erfaßt wird. Entsprechend der abnehmenden Kontraktionsleistung (Abb. 3), wird in den folgenden Stunden der Glykogenabfall langsamer. Dabei fällt auf, daß die Abnahme der Amplitude **rascher und stärker** erfolgt als die Glykogenabnahme. Histo - logisch zeigt sich, daß das Glykogen nach 2 - 3 Stunden in substratfreier Nährlösung in einzelnen Fasern, besonders in der schlechter mit O_2 versorgten Innenzone, **geschwunden ist.**

Das Verhalten der Kontraktionsamplitude spontanschlagender Meerschweinchen-Herzvorhöfe im Dauerversuch bei verschiedenen Substraten.

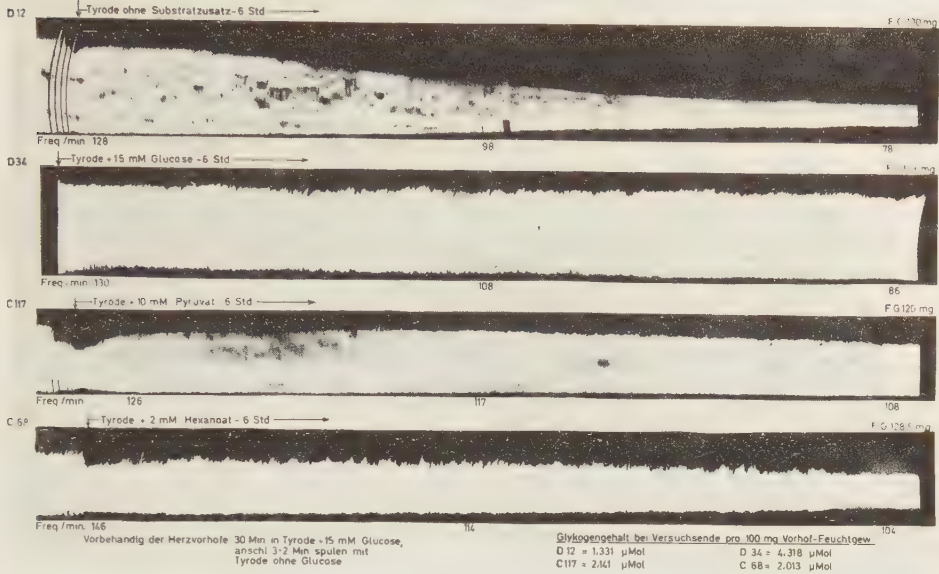
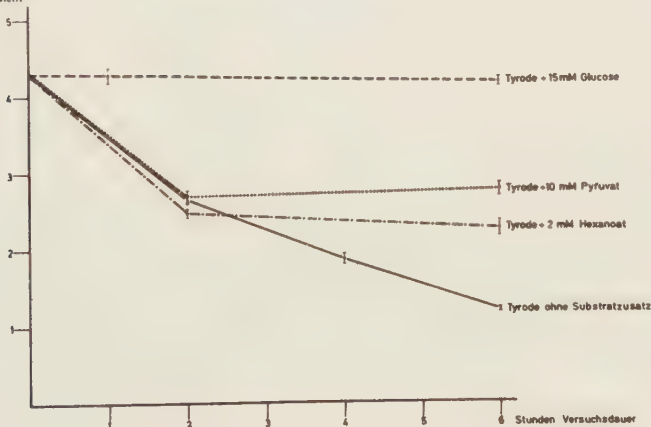


Abb. 3

Glykogengehalt in spontanschlagenden Meerschweinchen-Herzvorhöfen in Abhängigkeit von Substratzusatz und Zeit.

Glykogengehalt in µMol Glucose pro 100 mg Vorhof-Feuchtgewicht



1 µMol
Mittelwerte aus N=6 bei jedem Meßpunkt

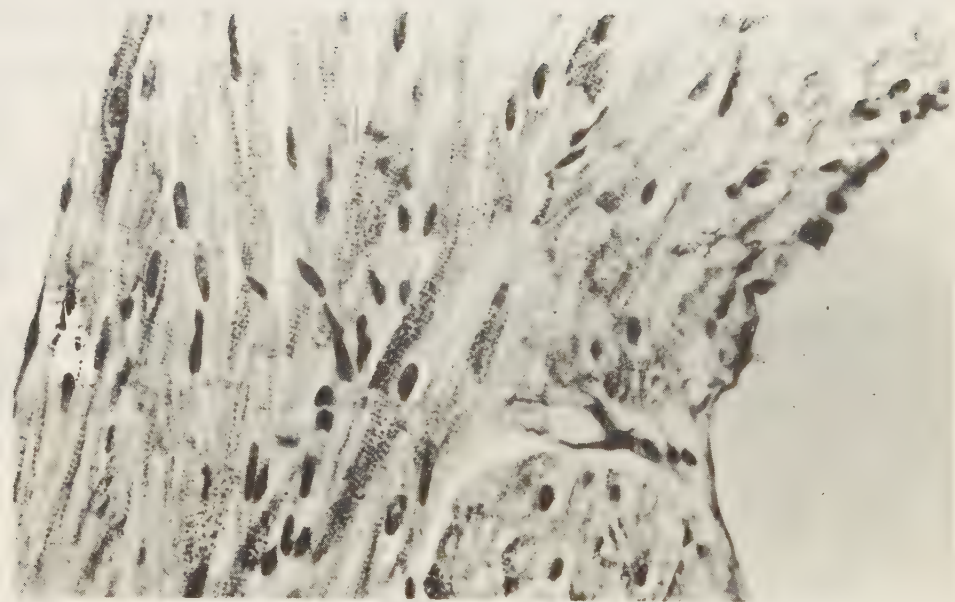


Abb. 5

Herzvorhof nach zweistündiger Inkubation in substratfreier Tyrodelösung.

In 100 %igem Alkohol fixiert. 7,5 μ -Paraffinschnitt.

PAS - Reaktion.

Glykogen in der Abbildung als schwarze Körnchen dargestellt. Zum großen Teil in Querstreifen angeordnet. Man erkennt deutlich den unterschiedlichen Glykogengehalt der einzelnen Fasern.

In der überwiegenden Zahl der Fasern jedoch ist der Glykogengehalt noch sehr deutlich sichtbar (Abb. 5). Die Muskelfasern verlieren also ihr Glykogen nicht gleichmäßig. Nach 8 - 10 Stunden kommt es zur Systolisierung und zunehmender Rückstandskontraktur.

2.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM Glucose!

(Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5 a, b, c, Abb. 6, Abb. 7, Tab.2, 11)

Es stellte sich nun die Frage, ob die Vorhöfe in funktionellen Versuchen in vitro ihr Glykogen über Stunden behalten können, wenn ihnen genügend exogene Glucose zur Verfügung steht. Dazu ließen wir je 6 Vorhöfe eine und sechs Stunden in einer Tyrodelösung mit 15 mM Glucose schlagen. Dabei zeigte sich, daß bis zum Versuchsende eine gute Funktion mit gleichbleibender Amplitude und nur langsam abnehmender Frequenz aufrecht-erhalten wird (Abb. 3), da die Vorhöfe über eine ausreichende Energieversorgung aus dem Kohlenhydratstoffwechsel verfügen. Es kommt im Verlauf der Versuche zu keinem signifikanten Verlust an Glykogen; auch nach 6 Stunden liegt es noch in der unteren Streubreite der Ausgangswerte (Abb. 4).

Histologisch zeigt sich an Vorhöfen, die 6 Stunden in Glucose geschlagen haben, ein reichlicher Glykogengehalt sowohl im linken, als auch im rechten Vorhof. Es fällt dabei auf, daß an einigen Stellen, besonders an der inneren Vorhofwand, einzelne Herzmuskelfasern fleckweise glykogenfrei sind. In den dickeren Abschnitten der Vorhofsepten wird in wenigen kleinen Bezirken die Grenzschiebendicke von 200 - 300 μ überschritten, und hier sieht man kleine anoxische Innenzonen (Abb. 5 a, b), wie bereits früher beschrieben wurde (SCHMID und SIESS 1956; SIESS und GLOMME 1968). Auch an unseren Präparaten konnten wir frühere Befunde bestätigen (SCHMID und SIESS 1956; SIESS und PETTE 1960), daß das Glykogen in Querstreifung im Herzmuskel lokalisiert ist (Abb. 5 c). Ein Teil liegt in gröberer Schollenform an der Innenwand des Sarkomms entsprechend der bekannten "Glykogenflucht" als Folge der Alkoholfixierung.



Abb. 5 a

Herzvorhof nach sechsstündiger Inkubation in Tyrodelösung mit 15 mM Glucose.

PAS - Reaktion. Lupen-Vergrößerung.

Man erkennt deutlich fleckweise in dickeren Abschnitten der Vorhofwandung kleine glykogenfreie Bezirke jenseits der aerob versorgten Zone.

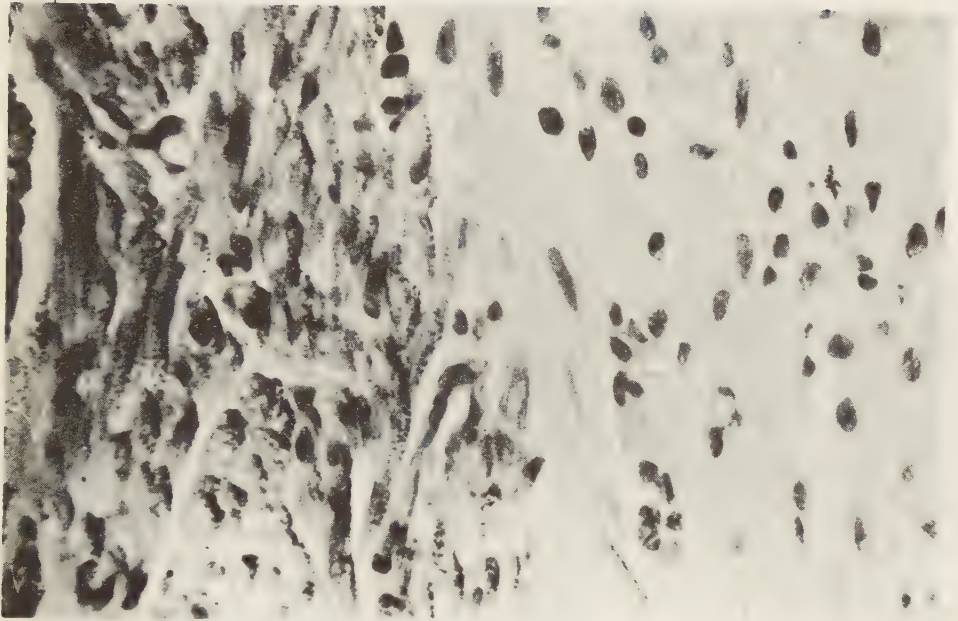


Abb. 5 b

Derselbe Schnitt wie Abbildung 5 a bei stärkerer Vergrößerung.

Grenze zwischen der aeroben, glykogenhaltigen Zone und der anoxischen, glykogenfreien Innenschicht.

Die anoxischen, glykogenfreien Herzmuskelfasern zeigen keine degenerativen Veränderungen.

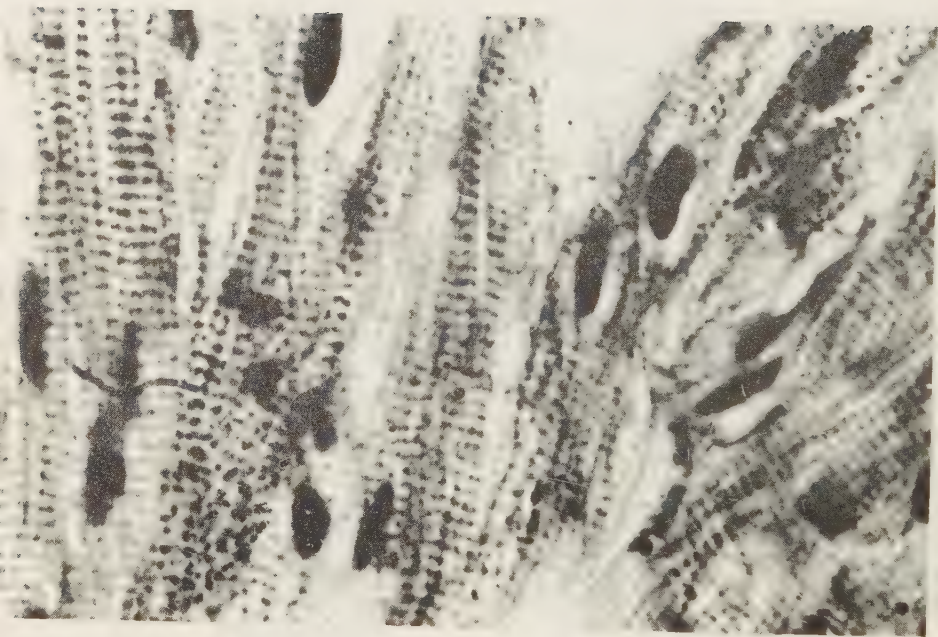


Abb. 5 c

Herzvorhof nach halbstündiger Inkubation in Tyrodelösung
mit 15 mM Glucose.

PAS-Reaktion. Öl-Immersion.

Man erkennt deutlich das Glykogen in Querstreifung in den
Herzmuskelfasern lokalisiert. Einzelne Fasern mit beson -
ders hohem Glykogengehalt zeigen außerdem großtropfiges
Glykogen schollenförmig eingelagert.

Um zu sehen, wie schnell und in welchem Maße exogene Glucose ins Glykogen eingebaut wird, führten wir Versuche mit ^{14}C -Glucose durch. Unter gleichzeitiger Messung von Leistungs- und Decarboxylierungsgeschwindigkeit inkubierten wir Vorhöfe mit 15 mM ^{14}C -Glucose (1 $\mu\text{C}/15 \mu\text{Mol}$) 1/2 Stunde, 1 1/2 Stunden, 3, 5 und 7 Stunden im geschlossenen rezirkulierenden System (Abb. 6). Es zeigte sich dabei in Abhängigkeit von der Zeit ein zunehmender Einbau von ^{14}C -Glucose ins Glykogen (Abb. 7). Die höchsten Einbauraten wurden mit 36 % und 26 % des Gesamtglykogens nach 5 und 7 Stunden gefunden. Das bedeutet, daß der Umsatz des endogenen Glykogens durch die von außen zugeführte Glucose ganz erheblich herabgesetzt wird. Pro Stunde wird durchschnittlich etwa 120 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ endogenes Substrat ersetzt, da der Gesamtglykogengehalt sich praktisch nicht ändert.

Auffallend ist, daß der Glykogengehalt signifikant niedriger ist als bei den übrigen Vorhöfen. Das könnte einerseits an der Fütterung liegen, andererseits muß daran gedacht werden, daß im rezirkulierenden System mit der Schlauchpumpe der O_2 -Partialdruck niedriger ist, als in der direkt durchperlten Fritte. Darauf deutet auch die gegen Schluß des Versuches stark abnehmende Kontraktionsleistung hin.

3.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 2 mM Hexanoat :

(Abb. 3, Abb. 4, Tab. 3, Tab. 12)

In weiteren Versuchen wurde geprüft, in welchem Maße andere Substrate imstande sind, die Glykogenolyse einzuschränken. Wir setzten zunächst in zwei Versuchsserien von 2 und 6 Stunden Dauer nach der üblichen Vorbehandlung 2 mM Hexanoat zu. Bei dieser Konzentration wird eine maximale Decarboxylierungsgeschwindigkeit erreicht und die Glucosedecarboxylierung um 56 - 60 % zurückgedrängt (SIESS und GLOMME 1968). Die Funktionskurve zeigt außer einer negativ inotropen Wirkung nach Zugabe des Substrates über Stunden keine wesentliche Verminderung der Funktion (Abb. 3). Der Glykogengehalt ist nach 2 Stunden auf etwa 60 % seines Ausgangswertes abgesunken (Abb. 4). Dies entspricht in den Versuchen mit ^{14}C -Hexanoat dem Zeitraum, in dem das Decarboxylierungsgleichge-

wicht erreicht wird. Auffallend ist, daß dieser Glykogene - halt über Stunden beibehalten wird. Selbst zwei Vorhöfe, die 12 Stunden in Hexanoat schlugen, entsprachen beide mit $2,2 \mu\text{Mol}$ pro Stunde und 100 mg F.G. dem Zweistundenwert. Es ist offensichtlich nach einiger Zeit ein Gleichgewichtszustand erreicht, bei dem kein Glykogen mehr am Umsatz beteiligt ist. Aufschluß - reich hierfür sind Einbauversuche mit ^{14}C -Hexanoat in die Glykogenfraktion (Tab. 12). Es fanden sich in acht Versuchen mit 6 - 8 Stunden Versuchsdauer übereinstimmend nur etwa $0,030 \mu\text{Mol}$ Hexanoat als Glykogeneinbau wieder. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von etwa 1 %, wenn man die bereits herabgesetzten Normalwerte unter Hexanoat als einzigem Sub - strat zugrunde legt. Wurde zusätzlich Glucose zugesetzt (Ver - suche R 21 - 24), so lagen die Glykogenwerte wesentlich höher. Es reicht dabei eine Inkubation von 30 Minuten Dauer, um den Glykogenehalt beträchtlich zu erhöhen. Auf diese Werte bezogen, liegt dann der prozentuale Anteil, der aus ^{14}C -Hexanoat stammt, wesentlich niedriger. Auffallend ist weiter, daß die Aktivität in der Lipidfraktion sehr gering ist. Sie beträgt nur 0 - 5 % der Gesamtaktivität.

4.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 10 mM Pyruvat :

(Abb. 3, Abb. 4, Tab. 4, Tab. IX)

In kinetischen Versuchen mit ^{14}C -Pyruvat war festgestellt worden, daß bei 10 mM Pyruvat-Außenkonzentration das Plateau der maximalen Decarboxylierungsgeschwindigkeit erreicht ist (SCHNEIDER, im Druck). Ganz analog zu Hexanoat wird in diesen Konzentrationen durch Zusatz von inaktivem Pyruvat die De - carboxylierungsgeschwindigkeit von ^{14}C -markierter Glucose herabgesetzt. Um das Verhalten des Glykogens unter Pyruvat zu untersuchen, inkubierten wir Vorhöfe in gleicher Weise wie in den Hexanoatversuchen in Tyrodelösung mit Zusatz von 10 mM in - aktivem Pyruvat. Es fällt auf, daß in den ersten 2 Stunden der Glykogenehalt der Vorhöfe auf ganz ähnliche Werte ab - sinkt wie bei Hexanoat (Abb. 4). Dieser Wert hält sich eben - falls über 6 Stunden konstant. Eine Herabsetzung der Kontrak - tionsamplitude läßt sich nur direkt nach Zusatz des Pyruvats nachweisen (Abb. 3). Die Amplitude erreicht bald wieder die Ausgangswerte und bleibt bis zum Versuchsende auf gleicher Höhe.

Einbauversuche mit verschiedenen molaren Konzentrationen von ^{14}C -Pyruvat zeigen nach 6 - 8 Stunden eine deutliche Abhängigkeit von der Außenkonzentration (Tab. IX). Mit 30 mM Pyruvat als einzigem Substrat, einer Konzentration, die weit im Plateau der maximalen Decarboxylierungsgeschwindigkeit liegt, findet sich nach 6 Stunden mit 0,244 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ ein Maximalwert. Dies entspricht umgerechnet auf Glucose 0,122 μMol in 6 Stunden pro 100 mg F.G., bzw. etwa 0,020 $\mu\text{Mol/h}$ pro 100 mg F.G. Da die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von ^{14}C -Pyruvat bei dieser Außenkonzentration im Mittel 1,9 μMol beträgt, ist der rückläufige Weg von Pyruvat ins Glykogen unter diesen Versuchsbedingungen praktisch zu vernachlässigen. Der Mittelwert aus 4 Versuchen mit 15 mM ^{14}C -Pyruvat entspricht mit 0,144 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ etwa dem mit 15 mM ^{14}C -Lactat gewonnenen Wert. (nach 6 - 8 Stunden Versuchsdauer)

Tabelle IX : Einbau von ^{14}C -Pyruvat in die Glykogenfraktion mit verschiedenen Konzentrationen bei 6 - 8 Stunden Versuchsdauer

Versuch Nr.	^{14}C -Pyruvat- Konzentration in mM	Eingebaut. ^{14}C -Pyruvat $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg}$ Vorhof	Versuch Nr.	^{14}C -Pyruvat- Konzentration in mM	Eingebaut. ^{14}C -Pyruvat $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg}$ Vorhof
R 140	30	0,244	R 107	8	0,108
R 59	15	0,204	R 108	8	0,064
R 61	15	0,129	R 68	5	0,046
R 110	15	0,103	R 64	2,5	0,095
R 111	15	0,138	R 66	2,5	0,030
R 62	10	0,125	R 67	2,5	0,023
R 69	10	0,109	R 65	1,25	0,036

5.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von ^{14}C -Lactat :

(Abb. 8, Tab. 13)

Lactat als wesentliches Substrat des Herzstoffwechsels (KEUL et al. 1965, 1966) wurde besonders eingehend bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Dauerversuch von 6 - 8 Stunden geprüft. Die kinetischen Daten, die dabei gewonnen wurden, sind an anderer Stelle niedergelegt (SCHNEIDER, im Druck). Die Ergebnisse zeigen eindeutig (Abb. 8), daß Lactat in geringen Mengen in Abhängigkeit von der Konzentration ins Glykogen eingebaut wird. Dabei weist die absolute Menge in $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg FG}$. in 6 Stunden nur eine geringe Streubreite auf. Es werden bei einer Konzentration von 15 mM Lactat im Mittel 0,152 μMol pro 100 mg F.G. in 6 Stunden umgesetzt. Dies entspricht, auf Glucose umgerechnet, 0,076 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$, bei einer Versuchsdauer von 6 Stunden sind das etwa 0,013 $\mu\text{Mol}/\text{h}$ pro 100 mg F.G. Bei einer Decarboxylierungsgeschwindigkeit von 1,6 $\mu\text{Mol}/\text{h}$ und 100 mg F.G. ist damit der Beitrag von Lactat zur Synthese von Glykogen wie bei Pyruvat nur sehr gering. Bei hohen Lactatkonzentrationen beträgt der prozentuale Anteil etwa 4 % des Gesamtglykogens.

Zeitversuche wurden mit Lactat nicht durchgeführt, doch ist im Vergleich zu den ^{14}C -Glucose-Versuchen anzunehmen, daß auch hier eine Zeitabhängigkeit besteht. Bei der ohnehin geringen Einbaurrate ins Glykogen erschien es wenig sinnvoll, noch geringere Inkubationszeiten als 6 Stunden zu verwenden, da hierbei die Genauigkeit der Bestimmungsmethode unterschritten worden wäre.

Aufschlußreich war in unseren Einbauversuchen weiter, daß sich eine deutliche Abhängigkeit des Glykogenverlustes von den verschiedenen Substratkonzentrationen zeigte. Bei den niedrigen Konzentrationen fiel der absolute Glykogengehalt am weitesten ab, während er bei höheren Konzentrationen wie erwartet höher war. In einigen Versuchen wurde zusätzlich Glucose zugegeben, was einen um etwa 100 % höheren Glykogengehalt zur Folge hatte, ohne daß aber dabei die absolute Lactateinbaurate verschoben wurde. Es fiel dabei auf, daß selbst Glucosezusatz in der letzten halben Stunde vor Ende des Versuchs zu einem starken Neuaufbau von Glykogen führte.

*Einbau von ^{14}C -Lactat in die Glykogenfraktion
isolierter Meerschweinchen-Herzvorhöfe
in Abhängigkeit von der Lactat-Konzentration bei 8-stündiger
Einwirkung.*

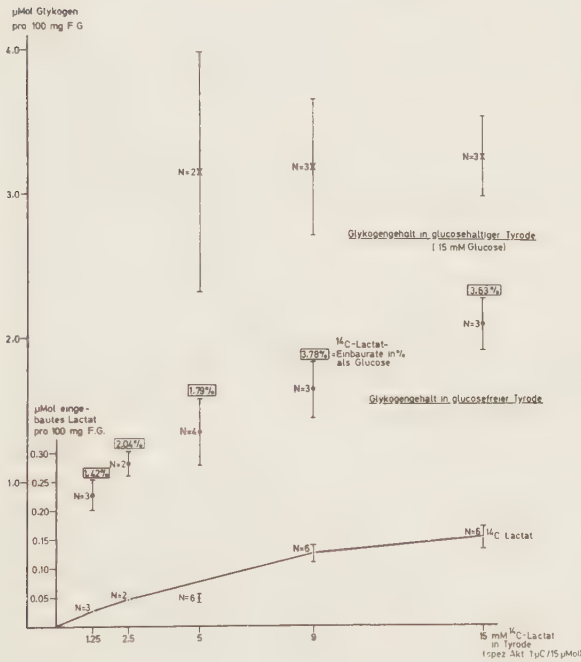


Abb. 8

Offensichtlich ist die Einbaurate von Glucose ins Glykogen bei einem Glykogendefizit der Vorhöfe wesentlich beschleunigt. Je nach dem Glykogengehalt war naturgemäß der Prozentsatz des Lactateinbaus als Glucose verschieden. Die prozentualen Werte der Abbildung 8 sind daher auf die Glykogenmittelwerte der Versuche ohne Glucosezugabe bezogen.

C) Einfluß von Adrenalin auf den Glykogengehalt isolierter Herz -
vorhöfe bei Inkubation mit verschiedenen Substraten :

1.) Inkubation in substratfreier Tyrode unter Zugabe von
Adrenalin : (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 12, Tab. 5)

Offensichtlich vermögen exogene Substrate wie Pyruvat, Lactat und Fettsäuren in Abhängigkeit von der Außenkonzentration nach Erreichen eines Gleichgewichts mit dem endogenen Substratanteil den Energiestoffwechsel der Vorhöfe weitgehend zu decken. Der anfängliche Glykogenschwund in den ersten bei den Stunden spricht dafür, daß bei Absinken des endogenen Substratspiegels der endogene Substratanteil an der Verbrennung fast ganz zurückgedrängt wird. Es bleibt allerdings die Frage offen, ob nicht Spuren aus dem Glykogenstoffwechsel zufließen müssen, um den Gesamtstoffwechsel in Gang zu halten. Es gibt manche Anzeichen, daß die Einschleusung von Glucose für die Kontraktionsenergie von Bedeutung ist. So ließ sich auch in unseren Versuchen immer feststellen, daß Zusatz von Glucose zu Vorhöfen, die zunächst mit einem der genannten Substrate alleine schlugen, sofort nach Glucosezusatz eine ausgeprägte positiv inotrope Wirkung zeigten (Abb. 12). Um dieser Frage nachzugehen, wurde versucht, mit Adrenalin den Glykogengehalt zum Verschwinden zu bringen. Es sollte dann an "glykogenfreien" Herzvorhöfen mit Substratzusatz die Funktion geprüft und festgestellt werden, ob eine Neusynthese von Glykogen stattfindet. Wir inkubierten aus diesem Grunde zunächst Vorhöfe verschieden lang in substratfreier Tyrode und gaben jede halbe Stunde Adrenalin zu, um eine kontinuierliche Wirkung zu gewährleisten. Nach Beendigung des Versuches bestimmten wir dann den Glykogengehalt.

**Abnahme des Glykogengehalts spontanschlagender Meerschweinchen-Herzvorhöfe
in substratfreier Tyrode-Nährlösung mit und ohne Adrenalin.**

Glykogengehalt
in $\mu\text{Mol Glucose}$
pro 100 mg Vorhof-
Feuchtwicht

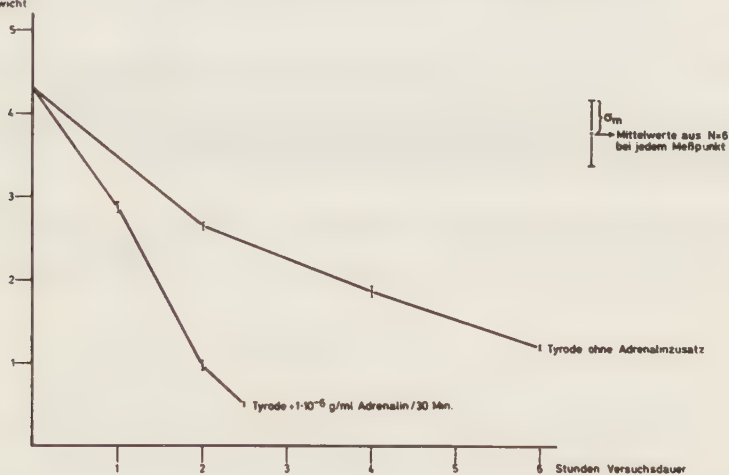


Abb. 10

Die Funktionskurve zeigt deutlich zuerst den stark positiv inotropen ^{und} chronotropen Effekt des Adrenalins (Abb. 9). Es kommt jedoch schnell zu einer raschen Abnahme der Kontraktionsamplitude mit zunehmender Rückstandskontraktur. Das Glykogen ist schon nach 2 1/2 Stunden bis auf 10 % seines Ausgangswertes abgesunken (Abb. 10). Auf dem Gipfel der Kontraktur bleibt Substratzusatz ohne nennenswerten Erfolg. Es zeigen sich entsprechend den erhaltenen Muskelfasern noch geringe Kontraktionen. Wie bereits früher festgestellt wurde (SCHMID und SIESS 1956), verlieren die Herzmuskelfasern ihr Glykogen nicht gleichmäßig und gleichzeitig. Außerdem besteht offensichtlich nur ein geringer zeitlicher Spielraum bis zur Irreversibilität der Funktion, wenn die Glykogenreserven erschöpft sind.

2.) Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von Glucose, Pyruvat oder Hexanoat unter gleichzeitiger Adrenalinzugabe :

(Abb. 9, Abb. 11, Tab. 6 - 8)

Um zu sehen, ob die Anwesenheit von Substraten die Glykogenolyse unter Adrenalin wesentlich einzuschränken vermag, wiederholten wir die Adrenalinversuche unter Zusatz verschiedener Substrate, wie Glucose (15 mM), Pyruvat (10 mM) und Hexanoat (2 mM). Wie Abbildung 11 zeigt, verzögern alle drei Substrate den Glykogenabbau unter Einwirkung von Adrenalin gegenüber den Versuchen in substratfreiem Milieu eindeutig. Nach drei Stunden, dem Zeitpunkt, in dem ohne Substrat der endogene Glykogengehalt unter Adrenalin bis auf etwa 0,5 μ Mol abgesunken ist und Kontraktur und Sistieren der Spontankontraktion die irreversible Zellschädigung anzeigt, ist unter Glucose, Pyruvat und Hexanoat die gesteigerte positiv inotrope und chronotrope Wirkung von Adrenalin praktisch noch voll ausgeprägt (Abb. 9), und der Glykogengehalt erst auf etwa 40 % seines Ausgangswertes abgesunken. Lediglich die prozentuale Leistungssteigerung bei Inkubation mit Hexanoat ist gegenüber den anderen Substraten geringer. Auch nach 6 Stunden Adrenalineinwirkung gelingt es nicht, die Herzvorhöfe glykogenfrei zu machen. Sie liegen mit 0,9 μ Mol/100 mg F.G. immer noch

Kontraktionsleistung des Meerschweinchen-Herzvorhofes unter Adrenalin
bei verschiedenen Substraten im Dauerversuch

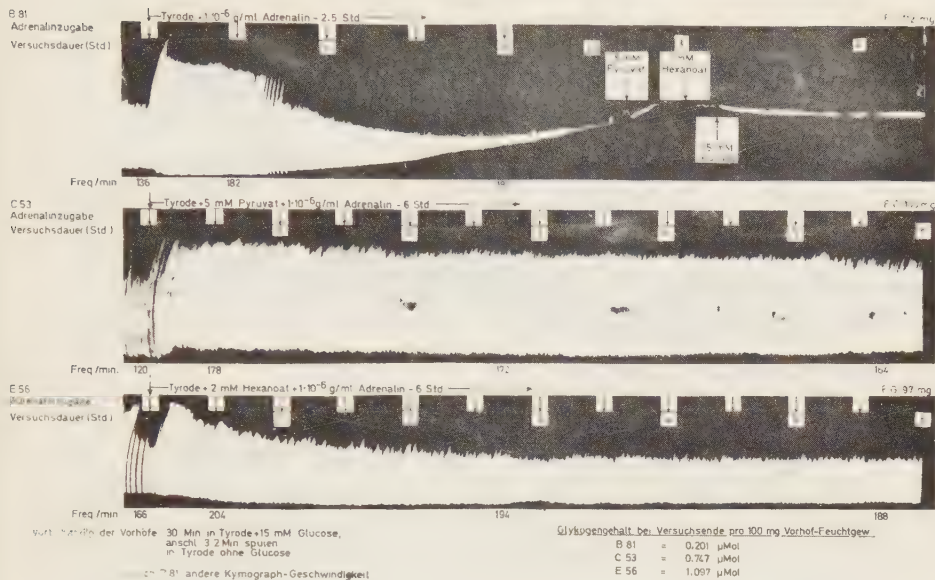


Abb. 9

Abnahme des Glykogengehalts spontaner Meerschweinchen-Herzvorhöfe
nach Zusatz von Adrenalin. ($1 \cdot 10^{-5}$ g/ml pro 30 Min.)

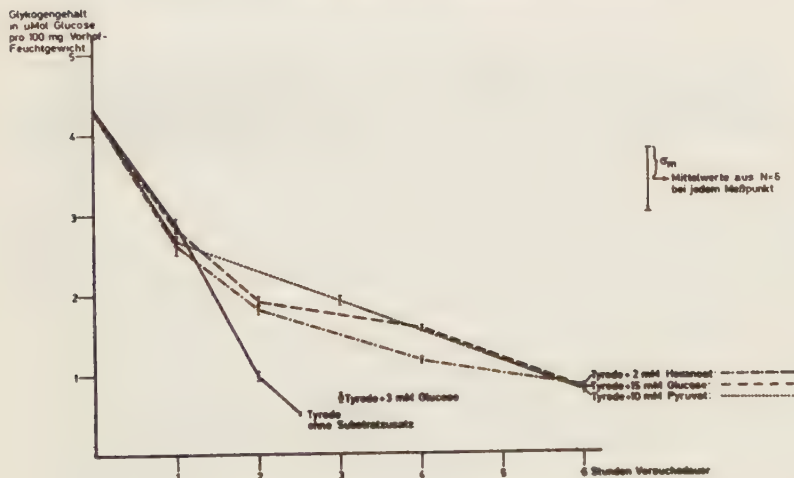


Abb. 11

Es glückte also nicht, einen völlig glykogenfreien Vorhof bei voller Kontraktionsfähigkeit zu halten.

Wie zu erwarten, führte Zusatz von Glucose ohne Adrenalin am glykogenverarmten Vorhof zum Wiederaufbau von Glykogen, wie auch schon früher bei den Lactatversuchen festgestellt worden war (Abb. 13).

4.) Inkubation in substratfreier Tyrodelösung unter Zusatz von Adrenalin nach vorheriger Gabe von Propanolol (Dociton^R): (Abb. 14, Tab. 10)

Um festzustellen, ob die verstärkte Glykogenolyse unter Adrenalin in substratfreier Tyrodelösung ausschließlich durch die Mehrarbeit als Folge der Frequenzsteigerung und der positiv inotropen Wirkung anzusehen ist, wurde in einer Versuchsserie durch Vorgabe von 1×10^{-6} g/ml Propanolol (Dociton^R) die positiv inotrope und chronotrope Wirkung von Adrenalin, das jede halbe Stunde in einer Konzentration von 1×10^{-6} g/ml zugegeben wurde, unterdrückt (Abb. 14). Übereinstimmend zeigte sich in vier Versuchen bei sehr geringer Streuung, daß sich Kontraktionsamplitude und Frequenz mit Ausnahme einer wenige Minuten dauernden positiv inotropen und chronotropen Wirkung bei der ersten Adrenalinzugabe so verhielten, als ob der Vorhof normal in substratfreier Lösung ohne Adrenalin schlagen würde. Der Glykogengehalt nach 2 1/2 Stunden entspricht genau den Werten, die Vorhöfe in substratfreier Tyrode ohne Adrenalin erreichen. Eine Trennung der β -rezeptorenblockierenden Wirkung von Propanolol auf die positiv ino- und chronotrope Wirkung von Adrenalin von der adrenalinbedingten Aktivierung der Phosphorylase ist daher nicht möglich. Die negativ inotrope Wirkung von Dociton (1×10^{-6} g/ml) wird allerdings durch Adrenalin voll aufgehoben.

IV.) Diskussion:

1.) Die Fütterungsabhängigkeit des Glykogengehaltes in Herzvorhöfen von Meerschweinchen:

Schon in früheren Veröffentlichungen ist darauf hingewiesen worden, wie sehr biologische Faktoren den Glykogengehalt der Herzmuskulatur beeinflussen. Dabei wird immer wieder betont, daß besonders die Fütterung der Tiere von ganz wesentlicher Bedeutung ist. LIEBIG (1940) hebt schon hervor, daß bei Kaninchen nach Ernährung mit Gemüseresten und Mohrrüben die höchsten Herzglykogenwerte erreicht werden. An Meerschweinchen untersuchten BOMSKOV und KAULLA (1942) die Glykogenwerte normaler Tiere bei verschiedener Fütterung. Dabei fanden sie, daß es beim Wechsel von Winter- auf Sommerkost zu einer wesentlichen Erhöhung der Herzglykogenwerte kam. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Befunde und zeigen eindeutig, daß ausschließliche Ernährung mit Trockenfutter zu einer starken Erniedrigung des Glykogens führte. Dabei wird nicht nur der absolute Glykogengehalt zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere beeinflusst, sondern Herzvorhöfe trockengefütterter Tiere resynthetisieren in glucosehaltiger Lösung ebenfalls weniger Glykogen als Tiere, die zusätzliche Grünfütter und Karotten erhalten hatten. Diese Befunde stimmen mit Beobachtungen der Decarboxylierungsgeschwindigkeit von ^{14}C -Glucose und ^{14}C -Hexanoat überein (GLOMME 1968, SIESS und GLOMME 1968), wo festgestellt wurde, daß nach Trockenfutter sowohl die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von Glucose, als auch die von Fettsäuren um 30 - 40 % herabgesetzt ist.

Wie unsere Untersuchungen ergaben, ist nun auch der Glykogengehalt von ausschließlich mit Trockenfutter ernährten Tieren um etwa 30 % erniedrigt. Damit verbunden ist eine deutliche Herabsetzung der Kontraktionskraft der Vorhöfe. Dies alles deutet darauf hin, daß der Gesamtstoffwechsel dieser Tiere stark erniedrigt ist. In diesem Zusammenhang ist zu erwägen, ob vielleicht ein Angriffspunkt in der Atmungskette vorliegt. Frühere Versuche am hiesigen Institut über den Gehalt an Ubichinon und dessen Redoxzustand in isolierten Herzvorhöfen von Meerschweinchen (HOFFMANN, KUNZ und SIESS 1964) haben allerdings keine Änderungen unter Trockenfutter ergeben. Auch Zugabe von Ascorbinsäure blieb wirkungslos, wie wir in eigenen

unveröffentlichten Versuchen fanden. Neuere Arbeiten (SHIPP et al. 1964) liefern Anhaltspunkte dafür, daß Thyroxin einen wesentlichen Einfluß auf den Glykogengehalt des Herzens hat. Es muß deshalb daran gedacht werden, daß sich unter verschiedener Kost die Schilddrüsentätigkeit ändert, worauf der stark erniedrigte Stoffwechsel hinweisen würde. Dem stehen aber Befunde entgegen (SHIPP et al. 1967), die gerade bei hypothyreoten Ratten eine starke Erhöhung des Glykogengehaltes fanden. Aus unseren Versuchen können wir zur Klärung dieser Frage nichts beitragen. Unsere absoluten Glykogengehalte stimmen mit denen anderer Veröffentlichungen gut überein. BOESKOV und KAULLA (1942) geben als normalen Glykogengehalt von Meerschweinchenherzen je nach Fütterung 0,60 - 0,90 % an, das entspricht umgerechnet 3,6 - 5,3 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ VINCENT und ELLIS (1962) fanden als Normalwerte des Glykogens in Meerschweinchenherzvorhöfen 0,54 bis 0,65 mg/100 mg. Diese Werte fallen umgerechnet mit 3,0 bis 3,6 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ in den unteren Bereich der von uns erhaltenen Werte.

2.) Glykogengehalt von Herzvorhöfen in Tyrodelösung mit und ohne exogene Substrate :

Wie die Versuche in substratfreier Nährlösung zeigen, fällt in den ersten zwei Stunden der Glykogengehalt um 0,7 μMol pro Stunde und 100 mg F.G. ab. Dieser Wert liegt nur wenig über dem Mittelwert der Decarboxylierungsgeschwindigkeit ^{14}C -markierter Glucose bei 15 mM Außenkonzentration (SIESS und GLOMME 1968). Wenn man bedenkt, daß bei 15 mM Glucose die endogene Glykolyse noch nicht völlig zurückgedrängt ist, stimmen beide Werte in der Größenordnung sehr gut überein.

Aufschlußreich hierfür sind die Einbauversuche mit ^{14}C -Glucose. Wie die Ergebnisse sehr deutlich zeigen, nimmt in Abhängigkeit von der Zeit der Anteil ^{14}C -markierter Glucose im Glykogen im Verlauf von 5 - 7 Stunden relativ gleichmäßig und linear zu. Da sich der Glykogengehalt selbst in dieser Zeit nicht signifikant verschiebt, muß entsprechend dem eingebauten aus ^{14}C -Glucose stammenden Glykogen gleichviel inaktives Glykogen in den Stoffwechsel abgegeben werden. Die Einbaurate von stündlich etwa 0,120 $\mu\text{Mol Glucose}/100 \text{ mg F.G.}$ im Mittel entspricht

in der Größenordnung fast genau der oben beobachteten Differenz. Es erscheint auf Grund dieser Befunde daher wahrscheinlich, daß bei einer Außenkonzentration von 15 mM Glucose und einer mittleren Decarboxylierungsrate von 0,66 $\mu\text{Mol/h}$ und 100 mg F.G. etwa 0,120 $\mu\text{Mol/h}$ (15 %) ins Glykogen eingebaut werden und umgekehrt auch in die Glykolyse und in die Verbrennung mit eingehen.

Zusatz von inaktivem Hexanoat vermag die Decarboxylierungsrate von ^{14}C -Glucose etwa um 50 % herabzusetzen. Auch eine weitere Erhöhung der Hexanoat-Konzentration kann diese Hemmung nicht weiter verstärken. Es ist nun interessant, daß der Glykogengehalt nach Zusatz von Hexanoat in den ersten beiden Stunden um etwa 50 % absinkt. Ähnliche Verhältnisse finden sich auch unter Pyruvat und Lactat. Man kann dies damit erklären, daß bei Zusatz von Substraten diese erst allmählich in den Stoffwechsel eingeschleust werden und erst nach einer gewissen Zeit ein Decarboxylierungsgleichgewicht erreicht wird. Bis zum Erreichen dieses Gleichgewichts muß zur Deckung des vollen Energiebedarfs Glykogen verbrannt werden. Die Abnahme liegt etwa in der Größenordnung der in substratfreier Tyrode gewonnenen Werte. Mit Einstellen des Decarboxylierungsgleichgewichts ändert sich im weiteren Verlauf der Glykogengehalt nicht mehr signifikant. Das bedeutet, daß bei hohen Konzentrationen von Pyruvat, Lactat oder Hexanoat das Glykogen offensichtlich nach Einstellung des Gleichgewichtes keine nennenswerten Anteile mehr zur Verbrennung beisteuert und aus dem aktiven Umsatz ausgeschlossen ist. Darauf weisen auch die Einbauversuche mit ^{14}C -markierten Substraten hin, die zeigen, daß von Hexanoat, Pyruvat und Lactat nur Spuren ins Glykogen fließen, während mit Glucose als exogenem Substrat das Glykogen mit etwa 15 % am Umsatz beteiligt wird. Wie die ^{14}C -Lactatversuche weiter zeigen, besteht bei niedrigeren Substratkonzentrationen eine Beziehung zwischen Höhe des exogenen Substratspiegels und endogener Glykogenkonzentration (Abb. 8). Liegt die Substratkonzentration niedriger, als sie der Vorhof zur Deckung seines Energiebedarfs benötigt, so findet entsprechend dem Mehrbedarf eine weitere Mobilisation von Glykogen statt.

Während Glucose auch am glykogenverarmten Herzvorhof sofort nach Zusatz eine Erhöhung des Glykogengehaltes bewirkt, findet sich unter Lactat, Pyruvat und Hexanoat auch nach vorheriger Glykogenverarmung durch Adrenalin kein nennenswerter Aufbau von Glykogen mehr (Abb. 13). Damit konnten die Ergebnisse früherer Untersuchungen, die mit histologischer Methodik an Zwerchfellen und Herzvorhöfen von Meerschweinchen gewonnen wurden, bestätigt werden (SCHMID und SIESS 1956).

Wie die Einbauversuche mit ^{14}C -Hexanoat zeigen, findet sich bei 2 mM Außenkonzentration auch nach 8 Stunden nur eine mittlere Einbaurrate von 0,025 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ wieder. Dies entspricht bei einer mittleren Decarboxylierungsrate von 0,80 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ einer äußerst geringen Einschleusung von 0,003 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ ^{14}C -Hexanoat pro Stunde. Auffallend war, daß auch in der lipidhaltigen Fraktion des ausgewaschenen Glykogens keine erhöhte Aktivität zu finden war. Doch sagt dies nach Art der Aufarbeitung der Herzvorhöfe nichts über einen tatsächlichen quantitativen Einbau in die Gesamtlipide aus.

Die Einbauversuche mit ^{14}C -Pyruvat und ^{14}C -Lactat zeigen übereinstimmend eine Abhängigkeit von der Außenkonzentration beider Substrate. Bei den höchsten Konzentrationen, bei denen auch eine maximale Decarboxylierungsgeschwindigkeit gefunden wurde, wurden viel höhere Einbauraten als bei niedrigeren Substratkonzentrationen gefunden. Die höchsten Werte fanden sich in einem Versuch mit 30 mM Pyruvat, bei dem nach 6 Stunden etwa 0,240 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ in der Glykogenfraktion wiedergefunden wurden. Das entspricht einer Einbaurrate von 0,040 μMol Pyruvat pro 100 mg F.G. und Stunde. Bei einer mittleren Decarboxylierungsgeschwindigkeit von 1,9 $\mu\text{Mol}/\text{h}$ und 100 mg F.G. bedeutet dies, daß bei hohen Pyruvatkonzentrationen etwa 2 % des stündlich umgesetzten Pyruvats in das Glykogen eingehen. Diese Werte dürften auch von Lactat bei dieser Konzentration erreicht werden, da die bei 15 mM für beide Substrate bei 8 Stunden Versuchsdauer gefundene mittlere Einbaurrate sich mit 0,152 μMol ^{14}C -Lactat pro 100 mg F.G., bzw. 0,144 μMol ^{14}C -Pyruvat pro 100 mg F.G. etwa entsprechen.

Vergleichswerte lagen uns nur von Versuchen mit markiertem Pyruvat am Zwerchfell der Ratte vor. VILLEE et al. (1951) fanden mit einer Konzentration von 30 mM ^{14}C -Pyruvat umgerechnet

eine Einbaurrate im Glykogen von 0,060 μMol ^{14}C -Pyruvat pro Stunde und 100 mg F.G. Nach zweistündiger Inkubation von Ratten - zwerchfellen in 2,6 mM ^{14}C -Pyruvat erhielten HIATT et al. (1957) umgerechnet 0,005 - 0,008 $\mu\text{Mol}/100$ mg F.G.; in 8 Stunden wären das 0,020 - 0,032 $\mu\text{Mol}/100$ mg F.G. Diese Werte liegen für die jeweiligen Konzentrationen in der Größenordnung der von uns gefundenen Einbauraten. Dies würde bedeuten, daß zwischen Herz - und Skelettmuskulatur prinzipiell keine Unterschiede bestehen.

Die Befunde zeigen, daß tatsächlich auch im Herzmuskel die Möglichkeit besteht, aus Pyruvat und Lactat Glykogen aufzubauen, doch spielt dies quantitativ keine Rolle. In einer Versuchsserie wurde die ^{14}C -Lactat-Decarboxylierung durch Zugabe von 2mM inaktiven Hexanoats gehemmt. Selbst unter diesen Bedingungen war kein vermehrter Lactateinbau im Glykogen festzustellen. Über die Wege des Einbaus der Substrate kann aus den Versuchen nichts gesagt werden. Für Hexanoat scheint hierbei bei seiner geringeren Einbaurrate ein anderer Weg vorzuliegen als für Lactat und Pyruvat. Daß die Beobachtung dieser geringen Einbauraten nicht auf methodisch bedingten Verunreinigungen beruht, zeigen die Versuche mit 15 mM Glucose, wo in allen Versuchen die gleiche Aktivität eingegeben wurde und die Einbaurrate in Abhängigkeit von der Zeit linear zunahm. Bei Verunreinigungen hätten die gleichen Aktivitäten schon nach kurzer Versuchsdauer festgestellt werden müssen.

3.) Glykogenolyse bei Adrenalinzusatz :

Adrenalin beschleunigt den Glykogenabbau in substrat - freier Nährlösung fast um 100 % (Abb. 10). Nach Substratzusatz findet sich in der ersten Stunde keine signifikante Differenz der Glykogenabnahme gegenüber substratfreiem Milieu, dagegen verläuft von dieser Zeit ab die Glykogenolyse wesentlich langsamer, wenn hohe Konzentrationen von Glucose, Pyruvat und Hexanoat zugegeben werden (Abb. 11). Das ist nach dem vorher Gesagten verständlich, da in der ersten Stunde, in der die Substrate noch nicht im Stoffwechselgleichgewicht sind, der beschleunigte Abbau des Glykogens durch Adrenalin vorherrscht. Wie die Versuche mit ^{14}C -Substraten zeigen (SIESS und GLOMME 1968,

SCHEIDER, im Druck) wird durch Adrenalin nach Einstellung des Gleichgewichtes sowohl die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von Glucose als auch von Hexanoat und Pyruvat beschleunigt. Offensichtlich spielen sich auch hier Gleichgewichte in den Anteilen an der Verbrennung auf die adrenalinbedingte Leistungssteigerung ein. Daß unter Adrenalin der Abbau von Glykogen von der Konzentration der zugegebenen Substrate abhängig ist, zeigen die Versuche mit 3 mM Glucose, in denen nach 3 Stunden Adrenalineinwirkung der Glykogengehalt auf ähnliche Weise absinkt wie in Tyrode ohne Substratzusatz unter Adrenalin, während mit 15 mM Glucose der Wert zur gleichen Zeit noch um das fast dreifache höher liegt (Abb. 11).

Eine substratfreie Muskelfaser ist offensichtlich nur wenige Minuten lebensfähig und irreversibel geschädigt, wenn nicht rechtzeitig Substrat zugefügt wird. Dies zeigen besonders deutlich die Versuche, bei denen in substratfreier Tyrode unter Adrenalin Herzvorhöfe in 2 1/2 Stunden unter zunehmendem Verlust an Funktion und allmählicher Systolisierung glykogenverarmt wurden (Abb. 9). Zugabe von Substrat auf dem Gipfel der Kontraktur hatte dann nur noch geringfügige Aktionen der wenigen noch erhaltenen aktionsfähigen Herzmuskelzellen zur Folge, auch wenn zusätzlich Adrenalin zugegeben wurde. In diesen Fällen fanden wir die niedrigsten Glykogenwerte von 0,1 - 0,2 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ Wurde dagegen der Herzvorhof mit 3 mM Glucose und Adrenalinzusatz unter voller Erhaltung der Kontraktionsamplitude glykogenverarmt und dann die restliche Glucose und das Adrenalin ausgespült, so kam es schon nach einigen Minuten zur Kontraktur. Wurde nun rechtzeitig Pyruvat oder Hexanoat zugesetzt, so konnte unter diesen Substraten die Kontraktionsfähigkeit über viele Stunden voll erhalten werden (Abb. 12). Der Glykogengehalt sank in diesen Versuchen auch nach 10 Stunden Versuchsdauer nicht unter Werte von 0,3 $\mu\text{Mol pro } 100 \text{ mg F.G.}$ Auch mit Adrenalin gelang es dann nicht, das restliche Glykogen bei voller Funktionsfähigkeit des Vorhofs unter 0,2 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$ zu erniedrigen. Dieser Wert entspricht auffallend den unter ^{14}C -Pyruvat und ^{14}C -Lactat gefundenen Einbauraten. Es gelang also nicht, einen Herzvorhof bei voller Funktion glykogenfrei zu machen. Weitgehend glykogenverarmte Vorhöfe beziehen jedoch offensichtlich ihre Kontraktionsenergie aus den zugesetzten exogenen Substraten.

Nachträglicher Glucosezusatz verbesserte hier in jedem Fall die Kontraktionsamplitude. Möglicherweise ist diese positiv inotrope Wirkung von Glucose mit aktivem Membrantransport in die Herzmuskelzelle verknüpft.

Um festzustellen, inwieweit die gesteigerte Glykogenolyse unter Adrenalin allein auf die positiv inotrope und chronotrope Wirkung zurückzuführen ist, wurden in einer kleinen Serie Versuche mit Propanolol (D_ogiton^R) als β -Rezeptorenblocker durchgeführt. Dabei konnten wir die Befunde von VINCENT und ELLIS (1962), die mit Dichlorisoproterenol arbeiteten, bestätigen. Die Blockierung der β -Rezeptoren hebt sowohl die Wirkung von Adrenalin auf die Funktion wie auch auf die Glykogenolyse auf. Das spricht dafür, daß die gesteigerte Glykogenolyse unter Adrenalin in erster Linie auf einer Steigerung der Herzleistung beruht, wenn man nicht annehmen will, daß Propanolol auch direkt die glykogenolytische Wirkung des Adrenalins blockiert. Wie Versuche am stillgestellten Herzvorhof zeigten, führte Adrenalin zu keiner Steigerung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit von Glucose oder Hexanoat, solange der KCl-Stillstand durch Adrenalin nicht unterbrochen wird (SIESS und GLOMBE 1968). Da in 15 mM ¹⁴C-Glucose bei Einstellung des Decarboxylierungsgleichgewichts nach etwa 3 Stunden auch bereits 15 % markierte Glucose im Glykogen eingebaut ist, müßte im Falle einer glykogenolytischen Wirkung von Adrenalin am stillgestellten Herzvorhof eine Steigerung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit festzustellen sein, was nicht der Fall war. Es wäre schwer verständlich, wenn bei optimaler Sauerstoffversorgung nur eine erhöhte Lactatproduktion als Folge eines gesteigerten Glykogenabbaus resultieren würde. Auch VINCENT und ELLIS konnten am ruhenden Herzen ebenfalls keine glykogenolytische Wirkung von Adrenalin feststellen. (1966)

V.) Zusammenfassung:

- 1.) Der Glykogengehalt isolierter spontanschlagender Meer -
schweinchenherzvorhöfe beträgt sofort nach Tötung der Tiere
 $3,795 \pm 0,115 \mu\text{mol}/100 \text{ mg F.G.}$ und nach halbstündiger
Inkubation in Tyrodelösung mit 15 mM Glucose $4,310 \pm 0,115$
 $\mu\text{mol}/100 \text{ mg F.G.}$ Bei ausschließlicher Fütterung mit Trocken-
futter sind die Werte signifikant um etwa 30 % gesenkt.
- 2.) In substratfreier Nährlösung entspricht der Glykogenabbau
in den ersten beiden Stunden einem Umsatz von $0,7 \mu\text{mol Glu -}$
 $\text{cose pro } 100 \text{ mg F.G. und Stunde}$. Entsprechend abnehmender
Kontraktionsleistung und Frequenz sinkt dieser Wert in den
folgenden Stunden ab. Nach 6 Stunden Versuchsdauer ist der
Glykogengehalt im Mittel auf etwa 27 %, die Kontraktions -
amplitude auf etwa 24 % und die Frequenz auf etwa 60 % der
Ausgangswerte abgesunken.
- 3.) Bei Inkubation mit 15 mM Glucose bleiben Glykogengehalt und
Kontraktionsamplitude über Stunden konstant.
- 4.) Bei Inkubation mit 2 mM Hexanoat und 10 mM Pyruvat fällt
zunächst in den ersten beiden Stunden der Glykogengehalt
entsprechend den Werten in substratfreier Lösung ab.
Von diesem Zeitpunkt an wird der Glykogengehalt über viele
Stunden konstant gehalten.
- 5.) Bei Inkubation mit $15 \text{ mM }^{14}\text{C-Glucose}$ wird diese in linea -
rer Abhängigkeit von der Zeit in Glykogen eingebaut.
Die Einbaurrate beträgt im Mittel $0,120 \mu\text{mol}/100 \text{ mg F.G. und}$
 Stunde und entspricht einem Anteil von 15 % der Gesamt -
glucoseaufnahme. Nach 6 Stunden Versuchsdauer werden etwa
30 % im Glykogen wieder-gefunden.
- 6.) $^{14}\text{C-Lactat}$ und $^{14}\text{C-Pyruvat}$ werden in Abhängigkeit von der
Außenkonzentration in Glykogen eingebaut. Bei Konzentra -
tionen mit maximaler Decarboxylierungsrate beträgt die Ein -
baurrate etwa 2 % der Gesamtaufnahme bei beiden Substraten.
Nach achtstündiger Versuchsdauer werden bis zu 4 % als Glu -
cose im Glykogen wieder gefunden.
- 7.) Von $^{14}\text{C-Hexanoat}$ stammende Aktivität wird nur in Spuren im
Glykogen beobachtet. Nach achtstündiger Versuchsdauer beträgt

die Einbaurrate $0,030 \mu\text{Mol}/100 \text{ mg F.G.}$

- 8.) Adrenalin steigert in substratfreier Nährlösung den Glykogenabbau in den ersten beiden Stunden um 100 %, wobei unter Abnahme der Kontraktionsamplitude mit Rückstandskontraktur der Herzvorhof nach $2 \frac{1}{2}$ Stunden erschöpft ist. Der Glykogengehalt beträgt zu diesem Zeitpunkt mit $0,500 \pm 0,025 \mu\text{Mol Glucose pro } 100 \text{ mg F.G.}$ 11 % des Ausgangswertes.
- 9.) In substrathaltiger Nährlösung (15 mM Glucose, 10 mM Pyruvat, 2 mM Hexanoat) erfolgt der Glykogenschwund unter Adrenalin ohne Beeinträchtigung der Funktion signifikant verzögert. Erst nach 6 Stunden erreicht der Glykogengehalt aber ohne Beeinträchtigung der Kontraktionsleistung noch etwa 11 - 15 % des Ausgangswertes.
- 10.) Bei Inkubation mit 3 mM Glucose führt Adrenalin in 3 Stunden ohne Beeinträchtigung der Funktion zu einem Glykogenschwund bis auf 15 % des Ausgangswertes ($0,707 \pm 0,071 \mu\text{Mol Glucose pro } 100 \text{ mg F.G.}$). Auf solche Weise glykogenverarmte Herzvorhöfe bleiben unter Hexanoat und Pyruvat als einzigem Substrat bis zu einer Beobachtungsdauer von zwölf Stunden voll funktionsfähig. Im Unterschied zu einer Inkubation mit Glucose wird aber keine Glykogenresynthese gefunden, die über die ^{14}C -Einbauraten hinausgeht.
- 11.) Propanolol ($1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$) unterdrückt eine Adrenalinwirkung von $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ auf Funktion und Glykogenolyse völlig.

VI.) Literaturverzeichnis:

- Balzer, H. Über den Mechanismus der Wirkung des
Palm, D. Reserpin auf den Glykogengehalt der Organe.
Naun.-Schmiedeb. Arch. exp. Path. u. Pharm.
Bd. 243, S. 65 (1962)
- Bell, C. Liquid Scintillation Counting.
Newton, H. Pergamon Press Inc. New York (1958)
- Bomskov, Ch. Beitrag zur Frage nach der Ursache der in der
Kaulla, N. Literatur niedergelegten Schwankungen des Gly-
kogengehaltes in Leber, Herz und Muskel gesun-
der Tiere.
Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.
Bd. 110, S. 603 (1942)
- Glomme, H. Untersuchungen über die Regulationen der
Energiebildung aus dem Kohlenhydrat- und
Fettstoffwechsel im isolierten Meerschwein -
chenherzvorhof und ihre Beeinflussung durch
Pharmaka.
Med. Inaug. Dissert. Marburg (1968)
- Hiatt, H. H. The Pathway of Hexose Synthesis from
Goldstein, M. Pyruvate in Muscle.
Lareau, J. J. biol. Chem. Bd. 231, S. 303 (1957)
- Horecker, B. L.
- Hoffmann, P. C. Changes in the Redox Quotient of Ubiquinone,
Kunz, H. W. Substrate Levels, and Energy-Rich Pospha -
Siess, M. tes Induced by Metabolic Inhibitors in
Isolated Guinea Pig Atria.
Biochem. Zeitschr. Bd. 339, S. 559 (1964)
- Isselhard, W. Das Herzglykogen unter verschiedenen Ver -
suchsbedingungen. Versuche zur Einschrän -
kung der Streuungen im Glykogengehalt
von Warmblütlerherzen.
Pflüg. Arch. f. d. ges. Phys.
Bd. 271, S. 337 (1960)

- Keul, J. Über den Stoffwechsel des Herzens bei Hochleistungssportlern.
- Doll, E. I. Die Substratversorgung des trainierten Herzens in Ruhe, während und nach körperlicher Arbeit.
- Steim, H. Pflüg. Arch. ges. Phys. Bd. 282, S. 49 (1966)
- Homburger, H.
- Kern, H.
- Reindell, H.
- Kerr, S. The carbohydrate metabolism of brain.
I. The determination of glycogen in nerve tissues.
J. Biol. Chem. Bd. 116, S. 1 (1936)
- Liebig, H. Der Einfluß der Ernährung auf den Kohlenhydratgehalt des Herzens.
Arch. f. exp. Path. Bd. 195, S. 618 (1940)
- Müller, K. Eine Untersuchungsmethode zur gleichzeitigen Bestimmung der Leistung und des Substratverbrauchs isolierter Meerschweinchenherzvorhöfe unter pharmakologischen Einwirkungen.
Med. Inaug. Dissert. Marburg (1965)
- Peter, U. Leistung und Glucosedecarboxylierung isolierter Meerschweinchenherzvorhöfe nach Einwirkung von Pharmaka unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen.
Med. Inaug. Dissert. Marburg (1967)
- Siess, M. III. Internat. Pharmacological Congress, Sao Paulo - Brazil (1966)
Abstracts of short communications lectures and symposia. S. 39.
- Siess, M. Demonstration of a method to investigate influences of drugs on efficiency and consumption of substrates of energy metabolism in arrested and beating isolated heart muscle preparations.
Naun.-Schmiedeberg. Arch. Pharm. exp. Path. Bd. 259, S. 217 (1968)
- Siess, M. Effects on efficiency and consumption of ^{14}C -glucose and ^{14}C -hexanoate in arrested and beating atria guinea pigs.
Naun.-Schmiedeberg. Arch. Pharm. exp. Path. Bd. 259, S. 196 (1968)

- Siess, M.
Pette, D. Die Lokalisation des Glykogens in querge -
streifter Muskulatur von *Locusta ungratoria*.
Biochem. Zeitschr. Bd. 332, S. 495 (1960)
- Siess, M.
Müller, K.
Peter, U. Die kontinuierliche Messung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit ^{14}C -markierter Substrate
des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels in
isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen unter
gleichzeitiger Bestimmung der Kontraktions -
leistung als Methode zur Prüfung herzwirksamer
Agentien.
Arzneimittelf. Bd. 18, S. 1245 (1968)
- Siess, M.
Glomme, H.E. Die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von ^{14}C -
Glucose und ^{14}C -Hexanoat im isolierten Meer -
schweinchenherzvorhof in Abhängigkeit von der
extrazellulären Substratkonzentration, ihrer
Konkurrenz, sowie der direkten Einwirkung von
Pharmaka.
Arzneimittelf. Bd. 18, S. 1357 (1968)
- Schmid, W.
Siess, M. Über die Grenzbedingungen von Zelleben und spe -
zifischer Zellfunktion am isolierten Muskel.
Pflüg. Arch. f. d. ges. Phys.
Bd. 263, S. 492 (1956)
- Shipp, J. C. Glucose and Lipid Metabolism in Heart Muscle:
Chaudhuri, B.N, Effects of Hypo- and Hyperthyroidism.
Matos, O. E. in:
Crevasse, L. E. Tanz, R.D., Kavalier, F. and Roberts, J.:
Myocardial Contractility, S. 423
Verlag: Academic Press, New York and London (1967)
- Schneider, P. Med. Inaug. Dissert. Marburg (im Druck)
- Villee, C. A. Metabolism of ^{14}C -Labeled Glucose and Pyruvate
White, V. K. by Rat Diaphragm Muscle in vitro.
Hastings, A. B. J. biol. Chem. Bd. 195, S. 287 (1951)
- Vincent, N. H. Inhibitory Effect of Acetylcholine on Glycoge -
Ellis, S. nolysis in the Isolated Guinea-Pig Heart.
J. Pharm. exp. Ther. Bd. 139, S. 60 (1963)

- Vincent, N. H. Pharmacologist, Bd. 8, S. 185
Ellis, S. zitiert nach :
 S. Ellis: "Introduction" S.437
 in: Tanz, R.D., Kavalier, F. and J. Roberts:
 Factors Influencing Myocardial Contractility
 Academic Press New York-London (1967)
- Weg, N. Beta-Scintillation Counting of Radioactive
 Tracers Insoluble in Toluene.
 Nature, Bd. 194, S. 180 (1962)

Tabellenhang.

Tabelle 1 : Inkubation in substratfreier Tyrodelösung

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vornhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vornhof in $\mu\text{Mol Glucose}$	Glykogen pro 100 mg F.G. in $\mu\text{Mol Glucose}$
B 10	2	157	4,362	2,778
B 13	2	136	3,966	2,916
B 33	2	138	3,209	2,325
B 34	2	132	3,805	2,883
B 35	2	135	3,607	2,672
B 36	2	128	3,097	2,420
$\bar{X}$ =				2,665
σ_m =				0,100
B 47	4	114	1,701	1,492
B 48	4	101	1,916	1,890
B 49	4	102	1,826	1,790
B 50	4	117	2,053	1,754
B 51	4	116	2,620	2,259
B 52	4	133	2,848	2,141
$\bar{X}$ =				1,877
σ_m =				0,144
B 69	6	113	1,634	1,373
B 70	6	119	1,541	1,295
B 55	6	105	0,975	0,928
D 10	6	106	0,976	0,921
D 11	6	129	1,720	1,421
D 12	6	100	1,331	1,331
D 13	6	100	1,142	1,141
$\bar{X}$ =				1,203
σ_m =				0,075

Tabelle 2 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM Glucose

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μ Mol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μ Mol Glucose
D 7	1	113	5,269	4,663
D 8	1	114	3,896	3,418
D 9	1	119	4,915	4,160
D 10	1	107	4,600	4,299
D 11	1	103	4,390	4,262
D 12	1	115	5,708	4,963
$\bar{X}$ =				4,294
G_m =				0,213
D 34	6	103	4,448	4,318
D 35	6	118	5,168	4,379
D 36	6	90	3,222	3,581
D 37	6	107	4,737	4,427
D 38	6	93	3,878	4,170
D 39	6	135	5,683	4,209
$\bar{X}$ =				4,180
G_m =				0,128

Tabelle 3 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 2 mM Hexanoat

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μMol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μMol Glucose
E 39	2	108	2,389	2,212
E 41	2	110	3,030	2,754
E 42	2	137	3,298	2,407
E 43	2	136	3,309	2,403
E 44	2	94	2,132	2,268
E 45	2	94	2,738	2,912
$\bar{X}$ =				2,492
σ_m =				0,118
C 63	6	102	2,269	2,224
C 64	6	124	3,418	2,320
C 65	6	114	3,267	2,866
C 66	6	133	3,232	2,430
C 67	6	128,5	2,233	1,744
C 68	6	128,5	2,577	2,013
$\bar{X}$ =				2,266
σ_m =				0,185
C 71	12	111	2,496	2,249
C 72	12	141	3,217	2,282
$\bar{X}$ =				2,265
σ_m =				0,040

Tabelle 4 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 10 mM Pyruvat

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μ Mol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μ Mol Glucose
B 37	2	155	4,069	2,625
B 39	2	147	4,446	3,024
B 40	2	146	3,134	2,146
B 41	2	122	3,342	2,739
B 42	2	147	4,338	2,981
$\bar{X}$ =				2,703
σ_m =				0,158
C 114	6	106	2,569	2,424
C 115	6	120	2,569	2,141
C 116	6	104	3,153	3,031
C 117	6	134	3,860	2,880
C 118	6	105	3,232	3,078
C 119	6	151	4,646	3,076
$\bar{X}$ =				2,771
σ_m =				0,162

Tabelle 5 : Inkubation in substratfreier Tyrodelösung
unter Zugabe von Adrenalin

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in $\mu\text{Mol Glucose}$	Glykogen pro 100 mg F.G. in $\mu\text{Mol Glucose}$
B 1	1	106	2,991	2,822
B 2	1	122	4,014	3,290
B 3	1	106	2,867	2,704
B 25	1	170	4,943	2,907
B 26	1	153	3,461	2,262
B 43	1	123	3,977	3,233
B 44	1	112	3,320	2,959
$\bar{X}$ =				2,882
σ_m =				0,131
B 4	2	138	1,041	0,754
B 8	2	138	1,814	1,314
B 9	2	135	1,288	0,954
B 11	2	157	1,654	1,053
B 16	2	171	1,377	0,805
B 17	2	158	1,010	0,639
B 23	2	99	1,159	1,171
B 75	2	105	1,220	1,161
B 76	2	109	0,979	0,898
$\bar{X}$ =				0,972
σ_m =				0,115
B 56	2 1/2	87	0,352	0,404
B 57	2 1/2	108	0,568	0,523
B 58	2 1/2	141	0,872	0,618
B 59	2 1/2	106	0,499	0,469
B 60	2 1/2	123	0,644	0,523
B 61	2 1/2	110	0,481	0,437
D 80	2 1/2	85	0,425	0,532
$\bar{X}$ =				0,500
σ_m =				0,025

Tabelle 6 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM Glucose
unter gleichzeitiger Adrenalinzugabe

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μ Mol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μ Mol Glucose
E 48	1	107	2,492	2,329
E 50	1	101	2,664	2,638
E 52	1	122	3,491	2,861
E 53	1	122	3,620	2,967
E 54	1	116	3,556	3,065
E 55	1	97	2,556	2,635
$\bar{X}$ =				2,749
σ_m =				0,110
C 15	2	130	2,798	2,152
C 16	2	116	2,152	1,654
C 85	2	97	1,626	1,676
C 86	2	87	1,474	1,694
C 87	2	133	2,640	1,985
C 88	2	108	2,565	2,375
$\bar{X}$ =				1,922
σ_m =				0,123
E 23	4	93	1,756	1,888
E 24	4	99	1,515	1,530
E 25	4	65	0,820	1,261
E 26	4	89	1,562	1,755
E 56	4	99	1,632	1,648
E 57	4	79	1,076	1,362
$\bar{X}$ =				1,574
σ_m =				0,094
D 93	6	106	1,153	1,088
D 94	6	123	1,175	0,955
E 27	6	90	0,877	0,975
E 28	6	98	0,834	0,851
E 29	6	91	1,039	1,142
E 30	6	85	1,017	1,090
$\bar{X}$ =				1,016
σ_m =				0,094

Tabelle 7 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 10 mM Pyruvat
unter gleichzeitiger Adrenalinzugabe

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in $\mu\text{Mol Glucose}$	Glykogen pro 100 mg F.G. in $\mu\text{Mol Glucose}$
B 25	1	170	4,943	2,391
B 26	1	153	3,461	3,020
B 71	1	130	3,108	2,869
B 72	1	150	4,530	2,612
B 73	1	138	3,960	2,907
B 74	1	116	3,030	2,262

$$\bar{X} = 2,677$$

$$\sigma_m = 0,119$$

C 10	3	120	1,701	1,418
C 11	3	124	2,798	2,257
C 17	3	87	1,847	2,123
C 18	3	81	1,307	1,614
C 19	3	91	2,134	2,345
C 20	3	108	1,732	1,603
C 21	3	69	1,365	1,979
C 22	3	95	1,939	2,041

$$\bar{X} = 1,922$$

$$\sigma_m = 0,119$$

C 47	6	130	1,322	1,016
C 48	6	98	0,768	0,783
C 49	6	107	0,873	0,815
C 50	6	94	0,523	0,556
C 51	6	81	0,798	0,985
C 52	6	115	0,497	0,432
C 53	6	100	0,747	0,747
C 54	6	99	0,697	0,705
E 11	6	100	0,665	0,665
E 12	6	87	0,976	1,122

$$\bar{X} = 0,782$$

$$\sigma_m = 0,065$$

Tabelle 8 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 2 mM Hexanoat
unter gleichzeitiger Adrenalinzugabe

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in $\mu\text{Mol Glucose}$	Glykogen pro 100 mg F.G. in $\mu\text{Mol Glucose}$
C 85	1	87	2,462	2,853
C 86	1	86	2,376	2,638
C 87	1	90	2,043	2,270
C 88	1	107	1,829	1,709
C 89	1	105	3,136	2,986
C 90	1	95	3,148	3,313
$\bar{X}$ =				2,628
σ_m =				0,233
C 86	2	86	1,921	2,233
C 95	2	95	1,601	1,686
C 98	2	98	1,810	1,870
C 104	2	104	1,503	1,446
C 144	2	119	2,117	1,779
C 145	2	100	1,305	1,305
$\bar{X}$ =				1,719
σ_m =				0,135
C 91	4	99	1,463	1,478
C 92	4	131	1,736	1,325
C 99	4	111	0,816	0,735
C 100	4	129	1,088	0,844
E 60	4	112	1,777	1,587
E 62	4	111	1,218	1,097
$\bar{X}$ =				1,177
σ_m =				0,044
C 138	6	106	1,544	1,456
C 139	6	105	0,878	0,836
C 140	6	138	1,401	1,015
C 141	6	93	0,997	1,072
C 142	6	148	1,818	1,228
C 143	6	81	0,817	1,008
E 56	6	97	1,064	1,097
$\bar{X}$ =				1,101
σ_m =				0,071

Tabelle 9 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 3 mM Glucose
unter gleichzeitiger Adrenalinzugabe

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μMol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μMol Glucose
C 7	3	123	0,644	0,523
C 8	3	138	0,560	0,405
C 33	3	96	0,782	0,815
C 34	3	107	0,489	0,466
C 35	3	119	1,066	0,896
C 36	3	106	1,157	1,091
C 39	3	97	0,997	1,028
C 40	3	112	0,498	0,445
C 41	3	115	0,843	0,733
C 42	3	118	0,961	0,814
C 43	3	120	0,617	0,561
$\bar{X}$ =				0,707
σ_m =				0,071

Tabelle 10 : Inkubation in substratfreier Tyrodelösung unter
Zusatz von Adrenalin nach vorheriger Gabe von
 1×10^{-6} g/ml Propanolol (Dociton^R)

Versuch Nr.	Versuchs- dauer Std.	Vorhof- Feuchtgew. in mg	Glykogen pro Vorhof in μMol Glucose	Glykogen pro 100 mg F.G. in μMol Glucose
E 1	2 1/2	115	3,228	2,807
E 31	2 1/2	115	2,667	2,319
E 32	2 1/2	115	2,491	2,166
E 35	2 1/2	130	3,238	2,490
$\bar{X}$ =				2,445
σ_m =				0,140

Vers. Nr.	Vorh. F.G. mg.	Vers. Dauer Std.	Glykogen pro 100 mg Feuchtg. in μMol Glucose	Gesamt-Aktivit. cpm	INT. + CYTOPL.		LL-FIDE		G L Y K O G E N				Eingeb. ^{14}C -Gluc. %
					Aktivität cpm _I	% der Ges.Akt.	cpm _{II} % der Ges.Akt.	cpm _{III}	% der Ges.Akt.	^{14}C -Gluc. in μMol pro Vorhof	^{14}C -Gluc. in μMol pro 100 mg FG	^{14}C -Gluc. in μMol pro 100 mg FG	
R 99	110	5	2,712	472740	288540	61,03	2280	0,48					
R100	144	7	2,517	527890	372540	69,25	2630	0,48					
R151													
a 1	136	3	1,027	166770	129220	77,48	1310	0,78					17
a 2	136	3	2,203	162240	121940	75,16	2060	1,20					15
a 3	116	3	2,365	160970	125160	77,75	1130	0,70					15
a 4	101	3	2,303	136010	101920	74,93	1250	0,91					17
N = 4				$\bar{X} = 1,974$		$\sigma_m = 0,344$	$\bar{X} = 0,334$						
b 1	100	1 1/2	2,293	143160	126980	88,69	1300	0,90					7,8
b 2	141	1 1/2	1,941	150948	125720	83,28	1050	0,69					10
				$\bar{X} = 2,117$		$\sigma_m = 0,175$	$\bar{X} = 0,190$						
c 1	123	1/2	2,944	83190	73080	87,84	1190	1,43					2,9
c 2	136	1/2	2,211	90180	81900	90,81	880	0,97					2,9
				$\bar{X} = 2,577$		$\sigma_m = 0,368$	$\bar{X} = 0,076$						

Tabelle 11 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 15 mM ^{14}C -Glucose

(R 99 - R 100 : spez. Akt. 1 $\mu\text{C}/7,5$ μMol ; R 151 a 1 - c 2 : spez. Akt. 1 $\mu\text{C}/15$ μMol)

Vers. Nr.	Vorh. F.S. mg	Glykogen ins 100 mg Feuchtg. in μ l Glucose	Zugabe von	Gesamt- Aktiv. cpm	Int. + GFW. Lsg.		LUFIDE		eff. in cpm	als Glucose od. Hexant. ¹⁴ C-Hexanoat		
					Aktivität cpm I	% der Gesamt.	cpm II	% der Ges. Akt.		Ges. Akt.	in μ l pro 100 mg FG	in μ l pro 100 mg FG
R 21	126	3,101	inakt. Gluc.	37740	34090	90,32	1650	4,37	2000	5,29	0,022	0,7
R 22	124	2,907	inakt. Gluc.	49660	44800	90,21	2500	5,03	2560	4,75	0,026	0,8
R 23	134	2,837	inakt. Gluc.	47910	43360	94,67	350	0,73	2200	4,59	0,023	0,8
R 24	123	3,446	inakt. Gluc.	36840	35910	92,45	50	0,12	2680	7,41	0,032	0,9
R 25	144	1,210	Adrenalin	57410	54390	94,73	----	----	3020	5,26	0,029	2,3
R 26	122	1,234	Adrenalin	51580	49560	96,08	----	----	2020	3,92	0,022	1,7
R 94	108	3,720	inakt. Gluc.	52220	46760	89,54	580	1,10	4000	9,34	0,060	1,5
R 95	97	0,985	Adrenalin	38310	35560	92,82	230	0,60	2520	6,57	0,030	3,0

$$\bar{X} = 0,030$$

Tabelle 12 : Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 2 ml. 14 C-Hexanoat bei 3 Stunden Versuchs-
dauer (spez. Akt. 1 μ C/15 μ l)

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtg. mg	Lactat- Konz. mM	Hemmung der Decarboxylg. d. Hexanoat mM	Glucose- Zugabe	% Gesamtkativität		Glucose- pro 100 mg F.G.	Eingeautetes 14C-Lactat µMol/100 mg F.G.
					Int. + Cytopl. %	Lipide %		
R 133	112	1,25	0,05 - 3,2	-	91,58	7,77	0,752	0,026
R 134	126	1,25	0,05 - 3,2	-	91,71	7,89	0,836	0,029
R 135	125	1,25	0,05 - 3,2	-	88,45	11,18	1,118	0,029
$\bar{X} = 0,911$								$\bar{X} = 0,028$
$\bar{G}_m = 0,105$								
R 131	98	2,5	0,05 - 3,2	-	90,43	8,99	1,041	0,046
R 132	89	2,5	0,05 - 3,2	-	93,86	5,79	1,208	0,048
$\bar{X} = 1,124$								$\bar{X} = 0,047$
$\bar{G}_m = 0,085$								
R 82	107	4	-	-	96,36	3,01	1,708	0,034
R 84	98	4	-	-	94,72	4,00	0,730	0,043
R 89	114	4	-	-	96,38	3,19	3,991	0,058
R 77	87	5	-	-	89,33	9,08	2,321	0,064
R 78	133	5	-	-	94,90	4,57	1,239	0,021
R 130	106	5	0,05 - 3,2	-	92,59	7,36	1,696	0,068
ohne Glucose								$\bar{X} = 1,343$
mit Glucose								$\bar{G}_m = 0,233$
								$\bar{X} = 3,156$
								$\bar{G}_m = 0,835$
								$\bar{X} = 0,048$
								$\bar{G}_m = 0,007$

Fortsetzung der Tabelle 13 a

Versuch Nr.	Vorhof- Feuchtg. mg	Lactat- Konz. mM	Hemmung der Decarboxylg. d. Hexanoat mM	Glucose- Zugabe	% Gesamtkativität		Glykogen- Gehalt in μ Mol Glucose pro 100 mg F.G.	Eingebautes 14 C-Lactat μ Mol/100 mg F.G.
					Int. + Cytopl.	Glykogen %		
R 85	103	8	-	+	90,82	8,47	2,247	0,131
R 86	136	8	-	-	94,77	4,42	1,943	0,061
R 87	104	8	-	-	96,16	3,66	1,690	0,144
R 88	97	8	-	+	91,19	8,13	3,544	0,154
R 89	99	8	-	-	93,42	5,91	1,283	0,094
R 121	70	10	-	-	93,21	6,70	2,204	0,131
R 122	49	10	-	+	76,98	22,50	3,780	0,159

ohne Glucose

$$\bar{X} = 1,638 \quad \bar{X} = 0,124$$

$$\sigma_m = 0,194 \quad \sigma_m = 0,015$$

mit Glucose

$$\bar{X} = 3,190$$

$$\sigma_m = 0,835$$

R 70	145	15	-	+	87,89	11,61	3,271	0,108
R 71	105	15	-	-	92,46	7,08	2,203	0,124
R 72	98	15	-	+	80,23	19,27	2,334	0,215
R 75	154	15	-	+	80,04	19,54	2,780	0,202
R 76	104	15	-	+	90,67	8,93	3,737	0,184
R 79	124	15	-	-	90,03	9,32	1,731	0,084

ohne Glucose

$$\bar{X} = 2,089 \quad \bar{X} = 0,152$$

$$\sigma_m = 0,182 \quad \sigma_m = 0,020$$

mit Glucose

$$\bar{X} = 3,262$$

$$\sigma_m = 0,276$$

Tabelle 13 b: (Fortsetzung von Tabelle 13 a)

Inkubation in Tyrodelösung mit Zusatz von 14 C-Lactat in verschiedenen Konzentrationen bei 8 Stunden Versuchsdauer (spez. Akt. von O-Lactat: 1 μ C/15 μ mol)

Lebenslauf.

Am 2. Februar 1943 wurde ich, Werner Itzel, als Sohn des Lehrers Johannes Itzel und seiner Ehefrau Elfriede geb. Wiesner in Sofia/Bulgarien geboren.

Von 1949 - 1953 besuchte ich die Volksschule in Läm - merspiel/Krs. Offenbach und anschließend das Leibniz - Gymnasium in Offenbach/Main. Nach Ablegung der Reifeprüfung im Jahre 1962 begann ich im Sommersemester 1962 mit dem Studium der Medizin an der Universität Frankfurt/Main, wo ich im Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Ab Wintersemester 1964/65 studierte ich dann an der Philipps-Universität Marburg und bestand hier im Dezember 1967 das Staatsexamen. Im Februar 1968 begann ich mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten in :

Frankfurt : Frick, Giersberg, Greven, Halbsguth, Heinz,
Müser, Róka, Royen, Schneider, Seubert,
Stark, Wezler.

Marburg : Berendes, Bickel, Buchholz, Braun-Falco,
Dittrich, Dölle, Du Mesnil de Rochemont,
Exner, Gedigk, Hardewig, Heuser, Jacob,
Knauff, Korb, Linneweh, Mann, Martini,
Marx, Sauer, Schiff, Schleyer, Schlosser,
Schmid, Schwaiger, Siegert, Siess, Staib,
Spiegelberg, Straub, Streicher, Würtele.

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. M. Siess für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung und Anleitung bei Durchführung der Arbeit bedanken.

Fräulein Bamberger und Herrn Rau danke ich herzlich für ihre wertvolle Hilfe bei der Ausgestaltung der Arbeit.

Frau Dr. Schaudé danke ich herzlich für die Anfertigung der histologischen Präparate.

